

Université de Montréal

**Étude des déterminants moléculaires de la signalisation des
récepteurs couplés aux protéines G et développement
d'outils pour l'étude de l'effecteur β -arrestine.**

par

Martin Audet

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en biochimie

Août, 2013

© Martin Audet, 2013

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude des déterminants moléculaires de la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G et développement d'outils pour l'étude de l'effecteur β -arrestine.

présentée par :

Martin Audet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Chartrand, président-rapporteur

Michel Bouvier, directeur de recherche

Marc Servant, membre du jury

Martin Lohse, examinateur externe

Vincent Poitout, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de protéines membranaires du génome humain. Ils transmettent les signaux extracellulaires provenant de plusieurs stimuli comme les odeurs, les ions, les hormones et les neurotransmetteurs, à l'intérieur des cellules. En se liant aux RCPGs, ces molécules contribuent à la stabilisation des changements conformationnels activateurs qui se propagent jusqu'au domaine intracellulaire des récepteurs. Ces derniers engagent ensuite un ou plusieurs effecteurs, comme les protéines G hétérotrimériques et les β -arrestines (β arrs), qui activent une cascade d'événements moléculaires menant à la réponse cellulaire. Récemment, la publication de structures cristallines de RCPGs liant des ligands diffusibles a offert une opportunité de raffiner à une résolution atomique les modèles des mécanismes de transduction des signaux. Dans la première partie de cette thèse, nous avons donc exploré les déterminants de la signalisation du récepteur prototypique β 2-adrénérique (β 2AR), induite par les β -bloqueurs. En ne tenant compte que de leur efficacités sur le β 2AR dans les voies de l'adénylate cyclase (AC) et des protéines kinases activées par les facteurs mitogéniques (MAPK), les β -bloqueurs peuvent être classés en 3 groupes distincts (agoniste inverse AC / agoniste MAPK, antagoniste neutre AC / agoniste MAPK et agoniste inverse AC / agoniste inverse MAPK). Afin de déterminer le lien entre leur efficacité et leur mode de liaison, nous avons réalisé des expériences d'arrimages moléculaires *in silico* entre des β -bloqueurs de chacun des groupes et la structure cristalline du β 2AR liée au carazolol. De manière intéressante, les ligands à l'intérieur d'un groupe partagent un mode de liaison, alors que ceux des ligands entre les groupes divergent, suggérant que le mode de liaison des β -bloqueurs pourrait être utilisé pour prédire leur l'efficacité. En accord avec cette hypothèse, nous avons prédit et confirmé l'efficacité agoniste MAPK du carazolol, un inverse agoniste AC du β 2AR se liant au récepteur de manière similaire au groupe inverse agoniste AC / agoniste MAPK. De manière intéressante, le groupement aryl des ligands agonistes inverses agonistes AC / agoniste MAPK, le seul groupement chimique variable de ce groupe, est prédite pour lier la région des 3^e et 5^e hélices transmembranaires (TM3 et TM5). Nous avons donc émis l'hypothèse que cette

région pourrait être un déterminant de l'efficacité de ces ligands. En accord avec cette dernière, la mutation de 2 résidus (T118I, S203A) localisés proches du site de liaison des groupements aryles des β -bloqueurs, prévient l'efficacité agoniste inverse de l'ICI-118551 sur la voie de l'AC sans affecter l'efficacité d'un agoniste, indiquant que cette région est importante pour la transmission de l'effet agoniste inverse, du moins sur la voie de l'AC.

Les β arrs sont des protéines d'échafaudage qui coordonnent la formation de complexes avec plusieurs dizaines d'effecteurs de signalisation. Originellement identifiées pour leur rôle dans la désensibilisation et l'internalisation des RCPGs, elles sont aussi d'importants effecteurs de la signalisation des RCPGs indépendante des protéines G hétérotrimériques. Cependant, contrairement aux protéines G hétérotrimériques, il n'existe que peu d'outils pour les étudier. Ainsi, la deuxième partie de la thèse est dédiée au développement d'outils pour l'étude des β arrs. À cette fin, nous avons d'abord tenté de transposer une méthode de mesure de l'interaction entre 2 protéines par la technologie de transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET) en microscopie et chez des souris transgéniques afin de mesurer de manière subcellulaire et dans un contexte natif l'engagement de la β arr à des RCPGs. Ainsi, nous avons établi les preuves de principe que le BRET peut être utilisé pour localiser l'interaction entre la β arr et le récepteur de la vasopressine de type 2 (V2R) sur une cellule au microscope et pour détecter l'interaction entre la β arr et le β 2AR sur des tissus de souris transgéniques exprimant ces protéines fusionnées avec des partenaires BRET. Finalement, il n'existe aucun inhibiteur pharmacologique ciblant les β arrs. Ainsi, grâce à la combinaison d'approches de criblage virtuel sur un modèle de la structure des β arrs et d'essais de validation cellulaire, nous avons développé un inhibiteur pharmacologique des β arrs. À l'aide de cet outil, nous avons confirmé l'implication des β arrs dans l'activation des MAPK par le V2R, mais aussi montré un nouveau rôle des β arrs dans le recyclage du β 2AR.

Les connaissances et outils développés dans cette thèse permettront de mieux comprendre les déterminants moléculaires de la signalisation des RCPGs et entre autres, grâce à des nouvelles approches pour étudier le rôle cellulaire et physiologique des β arrs.

Mots-clés : Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), β -arrestine (β arr), transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET), inhibiteur pharmacologique, criblage virtuel, microscopie, souris transgéniques, β -bloqueurs.

Abstract

G Protein-Coupled Receptors (GPCR) are members of the largest family of membrane protein in the human genome. They transduce the signal from a variety of stimuli like odors, ions, hormones and neurotransmitters, inside the cells. By binding directly to the receptors, these molecules stabilize activating conformational changes that are allosterically propagated through transmembrane to intracellular domains. Effectors like heterotrimeric G protein and β -arrestins (β arrs) are then engaged by activated receptors and trigger a cascade of signalling events leading to a cellular response.

Recently, the resolution of the crystal structure of GPCR that bind to freely diffusible ligands provided the opportunity to refine at an atomic level the models describing the mechanisms of receptor signal transduction. In the first section of this thesis, we have explored the determinants of the prototypical β 2-adrenergic receptor (β 2AR) signalling induced by β -blockers. Given their efficacy on Adenylate Cyclase (AC) and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways, β -blockers can be classified within 3 signalling groups (AC inverse agonist / MAPK agonist, AC neutral antagonist / MAPK agonist and inverse agonist for AC and MAPK). In order to gain insight on the relation between their efficacy and binding mode, we performed *in silico* binding experiments between β -blockers from each group and the β 2AR crystal structure bound to carazolol. Interestingly, ligands within a group share similar binding mode in contrast to those of different groups, suggesting that β -blockers binding mode could be used to predict their efficacy. In accordance to this hypothesis, we have predicted and confirmed that carazolol, an AC inverse agonist that bind to β 2AR in a similar way than the AC inverse agonist / MAPK agonist group, is indeed an agonist for MAPK pathway. Moreover, aryl chemical function from AC inverse agonist / MAPK agonist ligands, barely the only variable structure feature of this group, was predicted to bind β 2AR nearby the transmembrane helices 3 and 5 (TM3 and TM5). We thus have predicted that this region would be a determinant of the AC inverse agonist / MAPK agonist ligand efficacy. Accordingly, we found that mutation of 2 residues (T118I, S203A) close to the aryl moiety binding site prevents inverse agonist efficacy of ICI-118551 on AC pathway, without affecting

agonist efficacy, indicating that this receptor region is important for the efficacy of these group of β -blockers, at least on AC inverse agonism.

β arrestins are scaffolding proteins that coordinate protein complex formation with dozen of signalling effectors. First identified for their role on GPCR desensitization and internalization, β arrestins are also an important heterotrimeric G protein independent GPCR signalling effectors. However, in contrast to heterotrimeric G protein, only a few tools are available for their study. Thus, the second section of this thesis aim at developing tools for the study of β arrestins. For this purpose, we had attempted to transpose a method to measure protein-protein interaction that use Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) technology, in microscopy and in transgenic mice, in order to detect subcellular localization and in a native context the engagement of β arrestin to RCPGs. Thus, we have established a proof of principle that BRET can be combined with microscopy to locate an interaction between β arrestin and the type 2 vasopressin receptor (V2R) within a cell. Moreover, we have established a second proof of principle that we can detect β arrestin recruitment to β 2AR on cells extracted from tissues of transgenic mice expressing these proteins fused to BRET partner. Finally, there is no pharmacological inhibitor of β arrestins. Thus, using a combination of virtual screening and cellular validation approaches, we have developed the first pharmacological β arrestin inhibitor. With this novel tool, we have confirmed the implication of β arrestins in V2R-mediated MAPK activation, but also showed a new role of β arrestins in β 2AR recycling.

The finding and the tools presented in this thesis should allow to better understand the molecular determinants of GPCR signalling, and among other things, by proposing new tools to study β arrestins cellular and physiological roles.

Keywords : G Protein-Coupled Receptor (GPCR), β -arrestin (β arrestin), Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), pharmacological inhibitor, virtual screening, microscopy, transgenic mice, β -blockers.

Table des matières

Introduction.....	1
Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	1
Généralités	1
Architecture des RCPGs	4
Classification des RCPGs	5
Classification des ligands de RCPGs.....	7
Théorie pharmacologique d'activation des RCPGs	10
Les modèles analytiques	10
Théorie de l'occupation	10
Modèle opérationnel	12
Les modèles mécanistiques.....	14
Modèle à deux étapes.....	14
Modèle à deux états	15
Modèle du complexe ternaire simple.....	17
Modèle du complexe ternaire étendu.....	19
Modèle du complexe ternaire cubique.....	21
Signalisation multidimensionnelle (biaisée).....	22
Modèle probabiliste	23
Les effecteurs principaux des RCPGs.....	25
Protéines G hétérotrimériques.....	25
Généralités	25
Signalisation des sous-unités $G\alpha$	26
Signalisation des sous-unités $G\beta\gamma$	28
Modifications lipidiques des sous-unités	28
Structure tridimensionnelle.....	32
Mécanisme d'activation.....	32
Couplage au RCPG	35
Protéines kinases des RCPGs (GRK)	39

Les arrestines	40
Généralités et nomenclature.....	40
Structure tridimensionnelle.....	41
Reconnaissance moléculaire et activation	41
Hypothèse du code à barre de signalisation.....	48
Rôles cellulaires et physiologiques de la signalisation des β arrests.....	51
Engagement des β arrestines avec des protéines membranaires non-RCPG	62
Régulation de la signalisation des RCPGs.....	63
Désensibilisation	63
Désensibilisation indépendante de la phosphorylation	64
Endocytose.....	66
Resensibilisation	67
Adressage post-endocytaire des RCPGs	68
Rôles des modifications post-traductionnelles dans l'adressage des RCPGs	71
Ubiquitination	71
Sumoylation	73
Phosphorylation des β arrests.....	74
Nitrosylation	75
Structure tridimensionnelle des RCPGs.....	76
Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET).....	78
Généralités et principes.....	78
Applications du BRET dans des modèles cellulaires et physiologiques	81
Objectifs de la thèse	83
Objectifs spécifiques.....	84
Résultats.....	85
Article 1	86
Insights Into Signaling from the β_2 -Adrenergic Receptor Structure.....	86
Article 2	109
Subcellular Imaging of Dynamic Protein Interactions by Bioluminescence Resonance Energy Transfer	109
Article 3	132

Protein-Protein Interactions Monitored in Cells from Transgenic Mice Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer.....	132
Article 4	166
β arrestins inhibitor discovery by combined virtual screening and cell-based assays	166
Discussion	206
Retour sur les déterminants moléculaires de l'efficacité du β 2AR et des β -bloqueurs	206
Importance du développement d'outils moléculaires pour étudier les β arrs	222
Développement de nouvelles applications du BRET	223
BRET en microscopie	223
BRET dans un contexte de souris transgéniques	227
Identification d'un inhibiteur pharmacologique des β arrs	233
Conclusion	239
Bibliographie	241
Annexes	i
Annexe 1	ii
Liste des autres articles	ii
Annexe 2	iii
Restructuring G-Protein-Coupled Receptor Activation	iii
Annexe 3	iv
Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes	iv
Annexe 4	v
High-Throughput Screening of G Protein-Coupled Receptor Antagonists Using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer 1-Based β -Arrestin2 Recruitment Assay ..	v
Annexe 5	vi
Impedance Responses Reveal β ₂ -Adrenergic Receptor Signaling Pluridimensionality and Allow Classification of Ligands with Distinct Signaling Profiles	vi

Liste des tableaux

Tableau I. Liste des différentes sous-unités des protéines G hétérotrimériques	30
Tableau II. Liste des structures tridimensionnelles des arrestines	42
Tableau III. Liste des structures cristallines récentes de RCPG	78

Liste des figures

Figure 1. Les récepteurs couplés aux protéines G	4
Figure 2. Le modèle GRAFS de classification des RCPGs	7
Figure 3. Principes de pharmacologie des RCPGs.	9
Figure 4. Modèle de Del Castillo et Katz à deux étapes	14
Figure 5. Modèle à deux états	17
Figure 6. Modèle du complexe ternaire simple	19
Figure 7. Modèle du complexe ternaire étendu	20
Figure 8. Modèle du complexe ternaire cubique	21
Figure 9. Modèle probabiliste	24
Figure 10. Signalisation médiée par protéines G hétérotrimériques	31
Figure 11. Propriétés structurales des protéines G hétérotrimériques.	39
Figure 12. Structure cristalline de la β arr1 inactive	43
Figure 13. Activation de la β arr par les phosphates de la queue C-terminale des RCPGs	50
Figure 14. Exemple d'effecteurs formant un complexe direct avec les β arrs.	52
Figure 15. Échafaudage de protéines kinases par les β arrs	57
Figure 16. Endocytose, désensibilisation et adressage post-endocytaire des RCPGs	70
Figure 17. Échafaudages de l'AP2 et de la clathrine sur les β arrs	71
Figure 18. Principes du BRET	80
Figure 19. Activité de certains β -bloqueurs sur la voie de l'AC avec les récepteurs β 2AR de type sauvage, Y141F et Y141A.	210
Figure 20. Comparaison de la position des résidus analogues Y149 (β 1AR) et Y141(β 2AR) dans les structures cristallines en conformation inactive	211
Figure 21. Efficacité du carazolol sur la voie des MAPK	215
Figure 22. Structure de ligands agonistes inverses sur la voie de l'AC et des MAPK	216
Figure 23. Arrimage moléculaire du métoprolol et du bisoprolol dans un modèle du récepteur β 1AR humain	217
Figure 24. Structure chimique de β -bloqueurs agonistes inverse AC / agonistes MAPK.	220

Figure 25. Efficacité de l'ICI-118551 et de l'isoprotérénol dans la voie de l'AC sur des mutants du β 2AR.....	222
Figure 26. Détection d'un signal BRET provenant de tranches de cerveaux de souris	232

Liste des abréviations

5-HT1B	Récepteur à la sérotonine de type 1B
5-HT2A	Récepteur à la sérotonine de type 2A
5-HT4	Récepteur à la sérotonine de type 4
α 1AAR	Récepteur α -adrénergique de type 1A
α 1BAR	Récepteur α -adrénergique de type 1B
α 2AR	Récepteur α -adrénergique de type 2
δ OR	Récepteur aux opiacés de type δ
Δ 9-THC	Δ 9-tétrahydrocannabinol
μ OR	Récepteur aux opiacés de type μ
A1R	Récepteur à l'adénosine de type 1
A2AR	Récepteur à l'adénosine de type A2
AC	Adénylate cyclase
ACSF	Liquide cérebrospinal artificiel
ADN	Acide déoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AGAP2	GAP d'ARF contenant les domaines ankyrines répétés et PH de type 2
AKAP	Protéine d'encrage à la kinase A
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMSH	déubiquitineuse de la molécule associée avec le domaine de la molécule adaptatrice transductrice du signal homologue à Src de type 3
AP2	Protéine adaptatrice de type 2
AR	Récepteurs aux androgènes
ARF6	Facteur de ribosylation de l'adénosine diphosphate de type 6
ARNO	Facteur d'échange des nucléotides de ARF
AT ₁ R	Récepteur à l'angiotensine II de type 1
AVP	Arginine vasopressine
β 1AR	Récepteur β 1-adrénergique
β 2AR	Récepteur β 2-adrénergique

B2R	Récepteur à la bradykinine de type 2
BAD	Protéine promotrice de la mort cellulaire associée à Bcl-2
β arr	β -arrestine
BE	Boucle extracellulaire
BI	Boucle intracellulaire
BiFC	Complémentation fonctionnelle de fragment de protéine
BRET	Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance
Cav2	Canaux calciques entrants activés par le potentiel cellulaire de type 2
CB1	Récepteur au canabinoïdes de type 1
c-Cbl	E3 ubiquitine ligase du lymphome de la lignée B de casitas
CCD	Détecteur couplé à la charge
c-Fgr	Kinase du sarcome félin de Gardner-Rasheed
CKII	Kinase de la caséine de type 2
CRF1 α	Récepteur du facteur de relâche de la corticotropine de type 1 α
C-term	Queue C-terminale
CXCR1	Récepteur aux chimiokines de motif CXC de type 1
CXCR4	Récepteur aux chimiokines de motif CXC de type 4
CXCR7	Récepteur aux chimiokines de motif CXC de type 7
D1R	Récepteur à la dopamine de type 1
D1AR	Récepteur à la dopamine de type 1A
D2R	Récepteur à la dopamine de type 2
DAC	Diacylglycérol
DHHC	Enzymes de transfert de palmitate
DVL	Protéine <i>disheveled</i>
EGFR	Récepteur au facteur de croissance à l'épiderme
eNOS	Synthase d'oxide nitrique endothéliale
EPAC	Facteur d'échange du nucléotide guanosine dépendant de l'AMPc
ERK1/2	Kinases régulées par des signaux extracellulaires de type 1 et 2
ESCRT	Complexe de triage endosomiale requis pour le transport
FPR	Récepteur au peptide N-formyl
FRAP	Recouvrement de fluorescence après <i>photobleaching</i>

FRET	Transfert d'énergie de fluorescence par résonance
FSHR	Récepteur de l'hormone de stimulation folliculaire
FZD	Récepteur Frizzle
G	Transducteur
G α	Sous-unité α des protéines G hétérotrimériques
G β	Sous-unité β des protéines G hétérotrimériques
G γ	Sous-unité γ des protéines G hétérotrimériques
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GABAb	Récepteur au GABA de type b
GAP	Protéine d'activation de l'activité GTPasique
GASP	Protéine d'adressage associée aux RCPGs
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange des nucléotides
GFP	Protéines fluorescente verte
GIRK	Canal potassique rectifiant entrant régulé par les protéines G
GIT1	Protéine d'activation de l'activité GTPase de ARF
GMP	Guanosine mono-phosphate
GMPc	Guanosine mono-phosphate cyclique
GR	Récepteur au glucagon
GRK	Kinase des RCPG
GSK3 β	Kinase de la glycogène synthetase de type 3 β
GTP	Guanosine triphosphate
Hck	Kinase des cellules hématopoïétiques
HDAC	Déacétylase des histones
HTS	Criblage à haut débit
I κ B α	Inibiteur de NF- κ B de type α
IGFR	Récepteur au facteur de croissance similaire à l'insuline
IKACH	Canaux potassiques muscariniques entrants et rectifiants
IFN- γ	Interféron- γ
IP3	inositol-triphosphate
IP6	inositol-hexaphosphate

JNK	Kinases de l'extrémité N-terminale de c-jun
L	Ligand
LARG	RhoGEF associée à la leucémie
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LPA	Acide lysophosphatidique
LRG	Complexe ternaire ligand/récepteur/transducteur
LR	Complexe ligand/récepteur
M1	Récepteur muscarinique de type 1
M2	Récepteur muscarinique de type 2
MAPK	Protéines kinases activées par des signaux mitogéniques
MAPKK	Kinase des MAPK
MAPKKK	Kinase des MAPKK
MC4R	Récepteur à la mélanocortine de type 4
mGluR1	Récepteur metabotropique au glutamate de type 1
mGluR8	Récepteur metabotropique au glutamate de type 8
MMP	Métalloprotéases de la matrice extracellulaire
MVB	Corps multivésiculaires
NAM	Modulateur allostérique négatif
NES	Séquence d'export nucléaire
NF- κ B	Facteur nucléaire potentialisateur de chaînes légères κ de cellules B activées
NHE	Échangeurs Na ⁺ /H ⁺
NHERF-1	Facteur de régulation des NHE de type 1
NK1	Récepteur à la neurokinine de type 1
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NSF	Facteur sensible au N-ethylmaleimide
N-term	Queue N-terminale
OA1	Récepteur de l'albinisme oculaire de type 1
PAM	Modulateur allostérique positif
PAR1	Récepteur activé par les protéases de type 1
PAR2	Récepteur activé par les protéases de type 2

PDGFR	Récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDE	Phosphodiesterase
PH	Domaine homologue à la pleckstrine
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4-5-diphosphate
PLC	Phospholipase C
PKA	Protéine kinase dépendante du cAMP
PKC	Protéine kinase de type C
PP2	Protéine phosphatase de type 2
PTHR	Récepteur à l'hormone parathyroïdienne
R	Récepteur
RAP	Protéines apparenté à Ras
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RG	Complexe récepteur/transducteur
RGS	Protéines régulatrice de la signalisation des protéines G
RH	Domaine homologue aux RGS
RLuc	Luciférase de la <i>renilla reniformis</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RTK	Récepteur à activité kinase sur les tyrosines
SAPK	Kinases activées par le stress
SH3	Domaine d'interaction homologue aux Src de type 3
SMO	Récepteur <i>smoothened</i>
SNX1	Protéine d'adressage nexin-1
SST2A	Récepteur à la somatostatine de type 2A
STAT1	Transducteur du signal et activateur de transcription de type 1
T4L	Lysozyme T4
TC45	Tyrosine phosphatase des cellules T
TGFβ	Récepteurs aux facteurs de croissance transformant de type β
TM	Hélice transmembranaire
TNFα	Facteur de nécrose tumorale de type α
TRHR	Récepteur de la relâche de la thyrotropine

TRP	Canaux ioniques récepteurs transitoires du potentiel
UBPY	Déubiquitinase protéase de type Y spécifique à l'ubiquitine
USP20	Protéase spécifique aux ubiquitines de type 20
USP33	Protéase spécifique aux ubiquitines de type 33
V2R	Récepteur à la vasopressine de type 2
VDCC	Canal calcique dépendant du voltage
WNT	<i>wingless</i> / <i>int-3</i>
YFP	Protéine fluorescente jaune

*"We have to remember that what we observe is
not nature herself, but nature expose to our
method of questioning"*

Werner Karl Heisenberg

*Physics and Philosophy: The Revolution in
Modern Science (1958)*

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de thèse le Dr Michel Bouvier pour sa patience et pour avoir mis son extraordinaire talent scientifique au service de l'éducation d'un jeune adulte, à l'époque, fraîchement sorti de l'adolescence. Chaque jour, j'essaie de comprendre comment j'ai réussi à intégrer son laboratoire en 2002 malgré la cohorte de gens très brillants qui se bousculaient à sa porte. Probablement qu'un jeune étudiant ressemble à un minerai brut. Certains ont des extrémités saillantes en or et d'autres ont leurs pierres précieuses complètement enfouis. Ainsi, la qualité d'un produit fini dépend des outils du tailleur et seul ce dernier peut évaluer, à l'essai, le potentiel de son minerai. D'ailleurs, on dit qu'avec un peu de pression, le charbon se transforme en diamant. Pour ma part, Michel m'a fait réaliser un voyage intellectuel qui n'a pas de prix et je lui en serai éternellement reconnaissant. De son enseignement, trois mots me viennent à l'esprit: comprendre, synthétiser et convaincre. Ce ne sont pas des étapes à considérer séparément mais plutôt une conversation où l'une fait grandir l'autre. Michel, merci de m'avoir protégé quand j'ai fait des erreurs et de m'avoir laissé grandir et me définir scientifiquement avec une grande liberté. Je ne peux que m'imaginer dans ta position, avoir ces jeunes étudiants qui en plus de leur projet principal, poursuivent des idées très excitantes mais qui sont parfois en dehors des objectifs du laboratoire et qui te laissent souvent devant le fait accompli. Tu as probablement passé beaucoup de temps à devoir synthétiser tout ça dans des demandes de subvention afin d'assurer la subsistance du laboratoire. Quoiqu'il en soit, tu ne t'es jamais opposé à nos folies scientifiques et tu as toujours été là pour ramener nos hypothèses à quelque chose de cohérent. Je te vois comme une grande échelle, très haute, que l'on peut emprunter si l'on veut devenir plus intelligent. Merci de m'avoir donné la permission d'y déposer les pieds.

Je voudrais particulièrement remercier ma femme, Frédérique, que j'aime énormément et avec qui je partage tout. Elle est la pierre angulaire de ma thèse car rien de tout cela n'aurait été possible sans elle. Elle me soutient ainsi que notre fils à bout de bras depuis le début sans jamais fléchir et me permet de me réaliser scientifiquement et dans la vie. Elle efface mes doutes d'un regard et au-travers elle je m'affirme. Je veux lui rendre hommage car à chaque

fois que j'observe les autres je me trouve extrêmement chanceux de l'avoir à mes côtés. Fred, je t'aime et j'apprécie à chaque instant les sacrifices que tu fais. J'espère un jour pouvoir te rendre la pareille. À mon fils, Elliot, comme ta mère, tu es aussi une inspiration. Je vous aime.

Je voudrais aussi remercier ma famille immédiate pour leur support inconditionnel dans la réalisation de cette thèse de doctorat. Merci à mon frère Nicolas pour son enthousiasme et ses discussions enflammées. Merci à mon père, Robert, qui par ses conseils et ses souvenirs d'université a su m'inculquer la philosophie pour apprendre et interpréter les choses, une difficulté à la fois. Tu m'as montré que ce sont les parcours difficiles qui mènent plus loin. Merci à ma mère, Colette, pour la correction du manuscrit et les appels au calme dans les situations tendues. Merci à ma soeur, Éliane, pour son aide notamment quand elle m'a hébergé gratuitement au début de mes études et pour ses revues d'histoire. Merci à Faïza, Dominique, Thomas, Rafaëlle et Charles. Je veux remercier aussi ma belle famille, Georges et Johanne, pour leur encouragement ainsi que les temps précieux qu'ils m'ont offert à la campagne afin que je complète mes recherches et ce manuscrit.

Je voudrais aussi remercier le Dr Serguei Chteinberg. Tôt dans mon cursus gradué, il m'a montré l'abécédaire de la biochimie structurale ainsi qu'une façon originale d'observer les macromolécules qui définit une bonne partie de ma pensée scientifique, un peu comme un architecte. De plus, l'extrême profondeur de sa pensée structurale est un modèle pour moi et sûrement pour quelques autres étudiants qui ont eu le privilège d'assister à ses classes de maître. Lorsqu'elle est profonde, la raison pure derrière nos hypothèses s'avère très souvent à l'épreuve des faits. Assez souvent pour prendre quelques risques afin de mieux survivre en science.

Je voudrais remercier le Dr Christian Legouill pour son support et ses conseils au laboratoire. Tu m'as guidé dans certains moments difficiles de ma thèse et tu as mis les outils et ressources dans mes mains pour réaliser mes intuitions, sans la moindre garantie. Tu as été vraiment un catalyseur. Merci aussi à la Dre Monique Lagacé qui prend grand soin de nous au laboratoire et sans qui mes manuscrits ne seraient pas des articles, mais seulement des manuscrits. Merci au Dr Billy Breton pour avoir donné l'exemple du travail acharné et bien fait. Je voudrais remercier aussi à tous les autres membres du laboratoire que j'ai côtoyés au cours des onze dernières années, pour votre amitié et votre camaraderie.

Finalement, je voudrais remercier les organismes subventionnaires, notamment la Société canadienne d'hypertension, le Fond de recherche en santé du Québec et la Fondation des maladies du coeur du Canada, qui m'ont fait confiance et permis de continuer mon rêve scientifique.

Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Généralités

Avec ses 800 gènes, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de protéines membranaires du génome humain (Luttrell, 2008; Lagerstrom and Schioth, 2008). Ils transmettent le signal provenant de différents stimuli, comme la lumière, les ions, les neurotransmetteurs ou les hormones, vers l'intérieur de la cellule en activant des voies de signalisation biochimiques, notamment par l'engagement direct d'effecteurs ou de médiateurs protéiques de la signalisation comme les protéines G hétérotrimériques, menant à une réponse cellulaire et physiologique (Audet and Bouvier, 2012)(annexe 2, page iii de la section annexe). D'autres effecteurs comme les β -arrestines (β arrestins) vont servir d'intermédiaire à l'activation par les RCPGs de voies de signalisation souvent en parallèles ou de manière indépendante de l'engagement des protéines G hétérotrimériques (Luttrell, 2008).

L'importance physiologique et thérapeutique des RCPGs n'est plus à démontrer puisqu'ils sont la cible de 30 à 40 % de tous les médicaments prescrits (Overington et al., 2006). Les premières séquences codantes pour des RCPGs ont été clonées dans les années 80s et 90s ouvrant la voie à l'avènement de la biologie moléculaire dans le domaine de la pharmacologie (Liggett and Raymond, 1993; Dixon et al., 1986; Frielle et al., 1987; Kobilka et al., 1987b; Kobilka et al., 1987a; Lefkowitz et al., 1988). En effet, les gènes codant pour les RCPGs pouvaient maintenant être exprimés de manière artificielle dans des modèles de cellules en culture sous un environnement contrôlé. Cette découverte biotechnologique a révolutionné la pharmacologie des 50 dernières années et en a catalysé la progression conceptuelle. Ainsi, ces récepteurs ne représentent plus uniquement un concept expliquant les propriétés de ligands sur des tissus mais bel et bien des entités moléculaires protéiques dans un contexte cellulaire (Liggett and Raymond, 1993; AHLQUIST, 1948).

D'autres découvertes importantes sont venues s'ajouter au cours des 25 dernières années qui ont aussi eu un impact sur l'étude des RCPGs. D'abord, le développement de technologies performantes de séquençage de l'ADN à la fin des années 90s a mené à la publication de la séquence complète du génome humain en 2001 (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). L'être humain est constitué de plus de 20 000 gènes codant pour des protéines uniques. Aussi, la publication de plusieurs autres génomes de différents organismes ont suivi, entraînant l'explosion d'une nouvelle discipline scientifique, la bioinformatique, permettant l'identification exhaustive des récepteurs codés chez les organismes vivants. Cette discipline a notamment des applications profondes en médecine où l'identification des variations dans le génome des individus, des polymorphismes, permettant ainsi d'identifier des cibles pour le traitement des maladies. Plusieurs RCPGs présentent des polymorphismes associés à des conditions pathophysiologiques (Thompson et al., 2008). D'ailleurs, l'émergence de moyens de séquençage efficaces permettant la détermination du génome de chaque patient annonce l'avènement d'une médecine personnalisée appelée pharmacogénomique où le médicament prescrit sera adapté au génome du patient. Ensuite, le développement récent des méthodes de laboratoire ayant de la capacité de déterminer des interactions protéines-protéines à grande échelle a fait émerger l'ère de la protéomique. La cellule n'est plus un sac de lipide avec un centre aqueux où se noie quelques protéines ayant des fonctions plus ou moins précises mais devient un centre complexe ou des échafaudages de protéines et d'acides nucléiques constituent de véritables machines chimiques réalisant des tâches spécialisées nécessaires au maintien de la vie. La compréhension des rôles cellulaires et physiologiques des RCPGs a grandement profité de ces approches en permettant notamment d'identifier d'autres effecteurs que les protéines G hétérotrimérique, comme les protéines d'échafaudages β arrs, impliqués dans la signalisation des récepteurs (Pluder et al., 2006; Xiao et al., 2007). Il reste cependant beaucoup de questions sans réponses et il ne s'agit que d'un prélude à la recherche des prochaines années. Par exemple, les ligands activant la plupart des RCPGs n'ont pas encore été identifiés. Toutefois, la caractérisation de ces récepteurs, définis comme orphelins, sera possible grâce aux avancées biotechnologiques décrit plus haut (Chung et al., 2008).

Ainsi, l'étude des RCPGs est maintenant à sa maturité avec la publication de plus de 10 000 articles par année répertoriés dans Pubmed depuis 5 ans. D'ailleurs, plusieurs années

seront nécessaires pour comprendre pleinement l'impact des découvertes des 25 dernières années. Aussi, la détermination récente des structures tridimensionnelles de certains RCPGs liant les petites molécules librement diffusibles ouvre un important chapitre dans ce domaine d'études et constitue une carte de navigation atomique sur les déterminants de la transduction des signaux par les récepteurs. En effet, déjà au début de 2008, la structure en forme inactive du $\beta 2AR$ contenait de l'information pertinente sur les zones impliquées dans la transmission du signal qui pouvait être exploré par la combinaison de simulations informatiques, mutagenèse dirigée et de mesure de l'efficacité de signalisation (article 1, page 86 de la section résultat). Ainsi, la compréhension de la structure-fonction des récepteurs et des mécanismes de la modulation de leur activité cellulaire par des petites molécules chimiques ou leurs protéines partenaires, accélérée par l'élucidation des structures de tous les RCPGs dans différents états, amènera un renouvellement sans précédent dans la façon de concevoir la découverte des médicaments (Audet and Bouvier, 2012)(annexe 2, page iii de la section annexe).

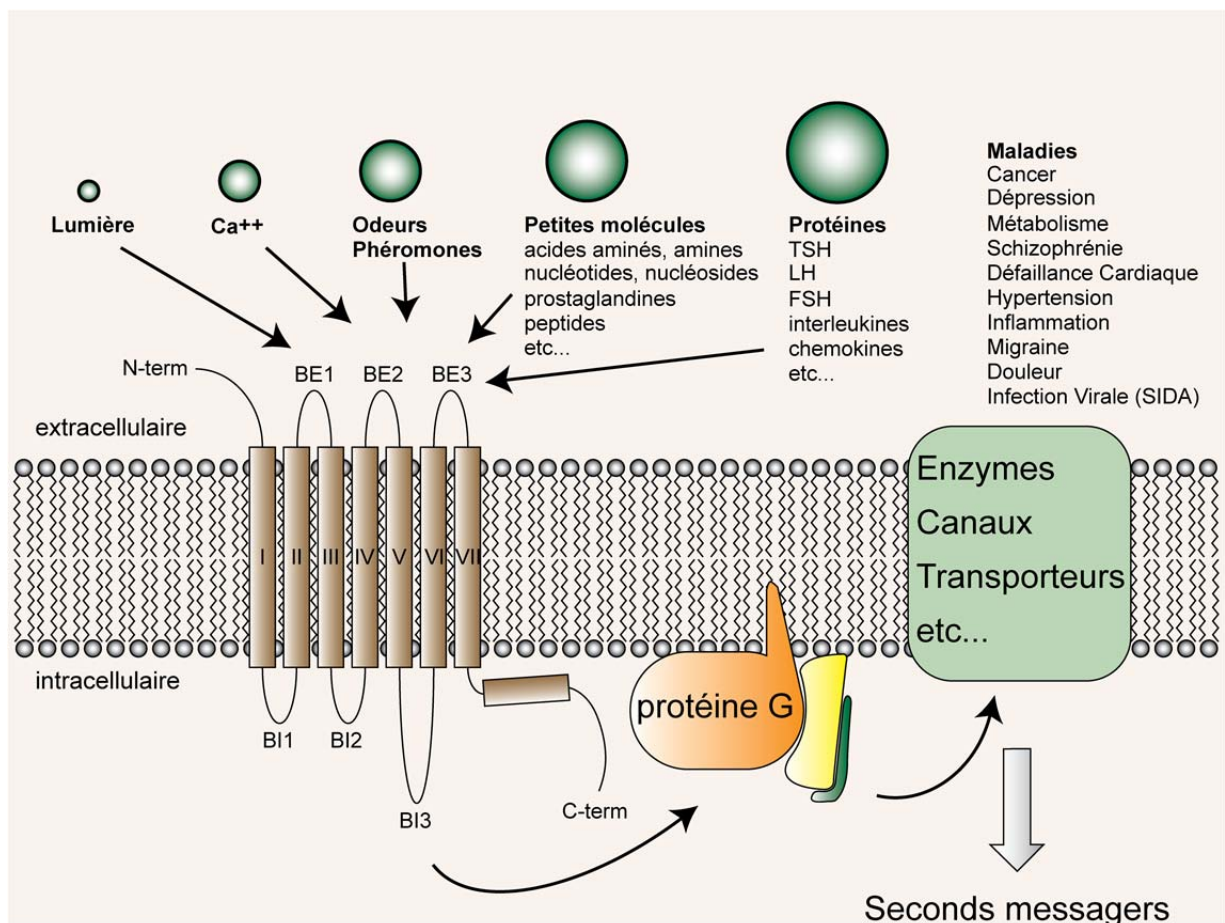


Figure 1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les RCPGs transmettent le signal provenant de différents stimuli, comme la lumière, les ions, les neurotransmetteurs ou les hormones, vers l'intérieur de la cellule en engageant notamment des protéines G hétérotrimériques. Ces derniers vont activer des divers effecteurs comme des enzymes et des canaux qui vont moduler la concentration de seconds messagers intracellulaires menant à une réponse cellulaire et physiologique. Plusieurs pathologies sont associées au dysfonctionnement de cette famille de récepteurs. Les RCPGs partagent la même topologie avec 7 hélices transmembranaires (TM) (I-VII), 3 boucles intracellulaires (BI), 3 boucles extracellulaires (BE), une queue N-terminale (n-term) et une queue C-terminale (c-term).

Architecture des RCPGs

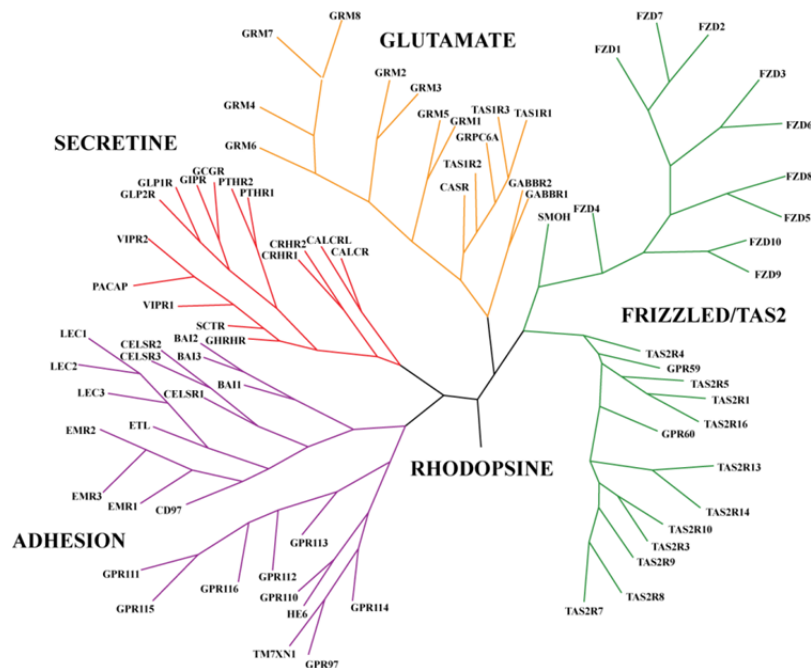
Tous les RCPGs partagent la même topologie qui consiste en une suite de 7 hélices alpha antiparallèles transmembranaires (TM) reliées entre elles par 3 boucles intracellulaires (BI) et 3 boucles extracellulaires (BE) ainsi qu'une queue N-terminale (n-term) et C-terminale (c-term) à chacune des extrémités (figure 1, page 4 de la section introduction). Pour la plupart des récepteurs, deux cystéines sur la BE2 et sur l'extrémité extracellulaire du TMIII forment un pont disulfure très conservé. Une ou deux autres cystéines peuvent être présentes dans la queue C-terminale, quelques résidus après le TMVII, et être palmitoylées formant un ancre entre la queue C-terminale et la membrane plasmique. Parfois, la queue N-terminale et quelques fois les BE peuvent être glycosylées. Aussi, le site de liaison naturel des ligands est formé par l'un ou l'autre, ou la combinaison de ces domaines: la queue N-terminale, les TMs ainsi que les BE. Aussi, dans la plupart des cas, le site de liaison n'est accessible que par la partie extracellulaire du récepteur. De leur côté, la queue C-terminale, les BIs ainsi que la partie intracellulaire des TMs forment le domaine de couplage du récepteur avec les effecteurs de signalisation et sont aussi responsables de la régulation négative de ses fonctions. La séquence et la dimension des boucles et extrémités varient énormément alors que celles des hélices transmembranaires sont très conservées et peuvent être regroupées par famille de récepteurs.

Classification des RCPGs

Chez l'humain, les 342 récepteurs non-olfactifs et 460 récepteurs olfactifs sont classés en 5 familles distinctes en fonction de l'homologie de leur séquence excluant les extrémités N- et C-terminales. Le système de classification est appelé GRAFS en référence à la première lettre du nom des différentes familles: similaire à la rhodopsine, sécrétine, glutamate, adhésion et frizzled / récepteur du goût de type 2 (figure 2, page 7 de la section introduction). Ce système intègre l'ancienne nomenclature car les groupes similaire à la rhodopsine, sécrétine et glutamate équivalent aux groupes classe A, B et C respectivement. Avec 701 récepteurs dont 241 non-olfactifs, la famille des récepteurs similaire à la rhodopsine est de loin celle qui contient le plus de membres. Elle est subdivisée en 4 groupes principaux, α , β , δ et γ ainsi que 13 sous-branches. Presque tous les récepteurs de cette famille partagent plusieurs éléments de séquences dont les motifs NSxxNPxxY sur le TM7 et D(E)RY(F) à l'extrémité intracellulaire du TMIII. Tous les RCPGs discutés dans cette thèse appartiennent à la famille similaire à la rhodopsine. Contrairement à la famille des récepteurs similaires à la rhodopsine, les autres familles ont moins de membres et ces derniers ont généralement des extrémités N-terminales plus imposantes. Ainsi, les 15 récepteurs de la famille des sécrétines possèdent un domaine N-terminal d'environ 60-80 acides aminés riches en cystéines qui lie des larges peptides. Aussi, la famille des récepteurs du glutamate contient 8 récepteurs au glutamate, 2 récepteurs GABA métabotropiques, un récepteur au calcium et 5 récepteurs du goût de type 1. Certains de ces récepteurs comme les récepteurs au glutamate et les récepteurs GABA_B sont des dimères obligatoires permettant aux extrémités N-terminales d'environ 300 à 600 acides aminés de former un domaine de liaison au ligand appelé "Venus flytrap" (Kunishima et al., 2000). Les 24 récepteurs de la famille des récepteurs d'adhésion ont aussi une très longue extrémité N-terminale de 200 à 2800 acides aminés et sont regroupés ainsi car ils contiennent des motifs qui sont similaires à ceux impliqués dans l'adhésion cellulaire comme le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) et les répétitions similaires à la mucine (McKnight and Gordon, 1998; Stacey et al., 2000). La famille des récepteurs frizzled est constituée notamment des 10 récepteurs frizzled et du récepteur smoothened. Plus particulièrement, les récepteurs frizzled (FZD) ont une extrémité N-terminale d'environ 200 acides aminés riche en cystéines qui participe à la liaison de l'hormone *wingless* / *int-3* (WNT) lors du développement des

organismes appartenant à la taxonomie métazoa. Cette famille de récepteurs contient aussi 13 récepteurs de goût de type 2 ayant une extrémité N-terminale très courte ne participant pas à la liaison de ligand. Finalement, il existe aussi 23 récepteurs qui ne sont pas classés dans ce système (Foord et al., 2005; Fredriksson et al., 2003).

De manière intéressante, certains récepteurs comme la plupart des FZD ne semblent pas engager les protéines G hétérotrimériques bien qu'ils soient classés parmi les RCPGs. Ainsi, il est très probable que l'appellation récepteurs couplés aux protéines G soit très réductrice et que les récepteurs à sept passages transmembranaires soient plus appropriés. On peut maintenant considérer ces derniers comme une plateforme d'activation de la signalisation engageant différents effecteurs dont les protéines G hétérotrimériques représentent l'exemple le mieux caractérisé. Cette vision serait partagée depuis longtemps si les récepteurs FZD avaient été clonés les premiers et leur signalisation étudiée avant la rhodopsine.



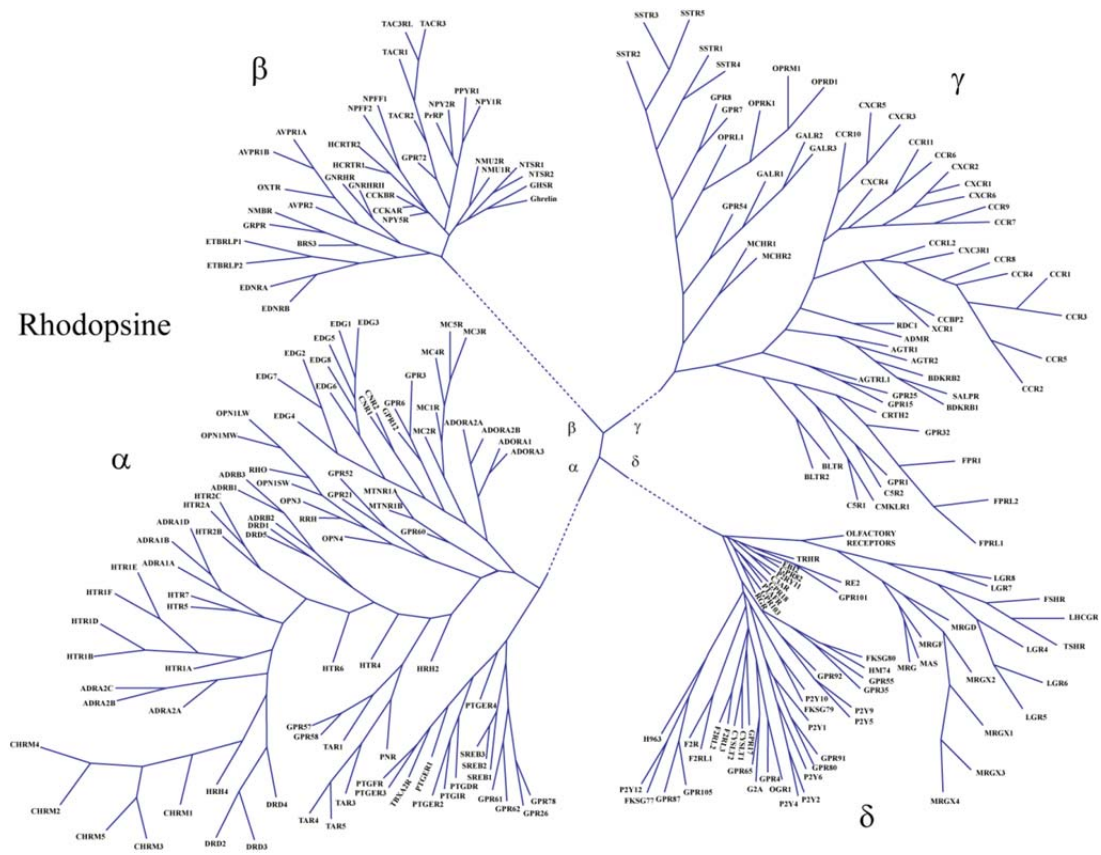


Figure 2. Le modèle GRAFS de classification des RCPGs. Les RCPGs exprimés chez l'humain sont classés en 5 groupes selon la conservation de séquence de leurs TM: Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled / Taste2 et sécrétine. Figure adaptée de (Fredriksson et al., 2003).

Classification des ligands de RCPGs

Les RCPGs activent plus ou moins fortement la signalisation intracellulaire de manière spontanée. Les ligands agissent en modulant plus ou moins cette activité basale. La capacité d'un ligand à modifier l'activité d'une voie de signalisation constitue son efficacité tandis que sa puissance est la facilité à laquelle il le fait. L'efficacité est déterminée généralement par l'activité maximale de signalisation induite par un ligand à haute concentration alors que la puissance est déterminée par la concentration du ligand lorsque la moitié de l'activité maximale est détectée. Sans en être strictement équivalente, la puissance dépend de l'affinité

du ligand pour le récepteur et en est un indicateur indirect. En effet, la théorie de l'occupation stipule que l'activité signalétique est proportionnelle à la fraction des récepteurs occupés par des ligands. Ainsi, le maximum d'activité devrait être obtenu à 100 % d'occupation des récepteurs. Cependant, l'activité maximale sur une voie de signalisation est souvent détectée lorsqu'une bonne fraction des récepteurs est encore inoccupée. Ainsi, ces récepteurs de surplus ou *spare receptors* sont présents sans être couplés à la voie de signalisation détectée. Dans ce cas la puissance du ligand va dévier de son affinité.

Les ligands de RCPGs sont classés en fonction de leur efficacité sur les voies de signalisation et de l'emplacement de leur site de liaison (figure 3, page 9 de la section introduction). La plupart des ligands se lient au site naturel d'action des hormones, le site orthostérique du récepteur. Les ligands activant une voie de signalisation d'un récepteur sont des agonistes. Au contraire, les ligands inhibant l'activité constitutive d'un récepteur sont des agonistes inverses. Une autre classe de ligand, les antagonistes neutres, n'ont pas d'impact sur l'activité du récepteur mais agissent plutôt en occupant le site orthostérique pour prévenir la liaison d'un autre ligand. Tous les ligands sont considérés comme ayant une efficacité partielle ou complète s'ils modulent partiellement ou complètement la voie de signalisation considérée (article 1, page 86 de la section résultats). Généralement, le ligand offrant la meilleure efficacité maximale sur une voie de signalisation sert de référence pour classer les autres ligands d'un récepteur.

Certains ligands agissent sur un autre site que le site naturel et sont considérés comme allostériques. Ils peuvent aussi être agonistes ou agonistes inverses mais la plupart du temps ils n'ont pas d'activités intrinsèques. Ces derniers vont plutôt moduler l'affinité et/ou l'efficacité des autres ligands (Neubig et al., 2003). Un ligand allostérique qui potentialise l'activité d'un autre ligand est un modulateur allostérique positif (PAM). Au contraire, un ligand allostérique qui inhibe l'activité d'un autre ligand est un modulateur allostérique négatif (NAM). D'autres types de ligands allostériques commencent à être mis au jour ayant notamment une activité intrinsèque (Schwartz and Holst, 2007).

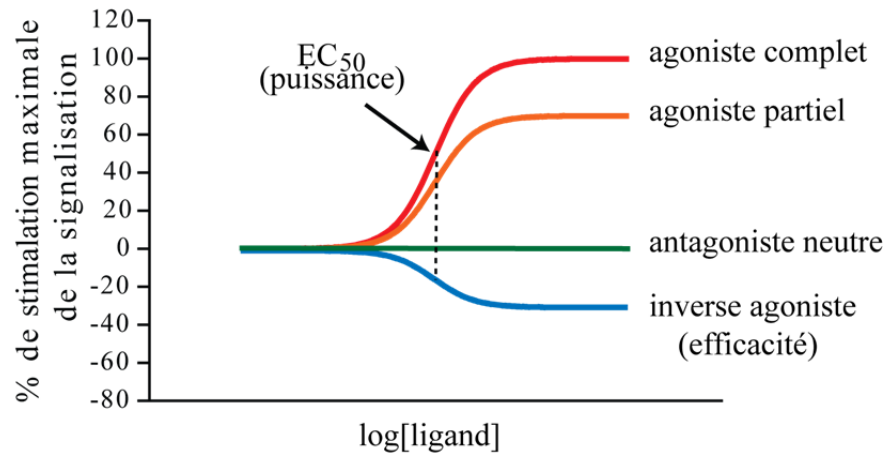


Figure 3. Principes de pharmacologie des RCPGs. Les agonistes activent une voie de signalisation alors que les inverses agonistes réduisent l'activité basale du récepteur. Les antagonistes n'ont pas d'activité sur la voie mais agissent en remplaçant un autre ligand dans le site de liaison. L'efficacité maximale d'un ligand peut être partielle par rapport à un autre ligand. La puissance est mesurée par la concentration d'un ligand quand l'efficacité mesurée est à 50 % de l'efficacité maximale.

Il est à noter que la vaste majorité des molécules endogènes qui lient des RCPGs chez l'humain sont des agonistes sur la voie de signalisation des protéines G hétérotrimériques. Deux exceptions notables connues sont les inverses agonistes naturels 11-cis-retinal de la rhodopsine et l'hormone agouti du récepteur à la mélanocortine de type 4 (MC4R) (Ersoy et al., 2012; Palczewski et al., 2000). Cependant, bien que les deux molécules lient leur récepteur respectif de manière orthostérique, les mécanismes menant à leur efficacité agoniste inverse sont différents. En effet, le 11-cis-rétinal est lié de manière covalente à la rhodopsine et la stabilise en conformation fermée-inactive. Au contraire, dans le cas du MC4R, dont l'activité constitutive est induite par des interactions avec sa queue N-terminale, l'efficacité inverse agoniste de l'agouti semble provenir de l'inhibition de l'activité produite spécifiquement par ce domaine du récepteur (Ersoy et al., 2012). Il n'est pas connu si agouti serait un agoniste pour une autre voie de signalisation.

Théorie pharmacologique d'activation des RCPGs

La pharmacologie tente, entre autre, de répondre à la question suivante: quel est le lien entre la concentration d'un ligand dans un tissu et sa réponse. Pour ce faire, certains modélisent la manière dont une hormone, un récepteur et parfois un effecteur s'engagent mutuellement dans le processus menant à l'activation de la signalisation et par la suite à la réponse biologique. Comme toutes les hypothèses, ils sont créés au meilleur des connaissances du moment et leur évolution suit la chronologie des découvertes. Devant la complexité des réponses cellulaires, les modèles pharmacologiques sont cruciaux pour interpréter la transduction de la signalisation cellulaire et prédire l'action d'une hormone sur un tissu biologique. La prochaine section présente les modèles pharmacologiques importants.

Les modèles analytiques

Théorie de l'occupation

Aussi appelé le modèle de Clark-Gaddum-Stephenson, la théorie de l'occupation a été longtemps utilisée pour expliquer la relation entre la liaison d'une hormone à un récepteur et son effet sur un système (Clark, 1926; Gaddum, 1926; STEPHENSON, 1956). Elle a émergé au siècle dernier lorsque Clark et Gaddum, s'inspirant du modèle de Langmuir dérivant la loi d'action de masse pour décrire l'adsorption des gaz sur une surface, émirent les hypothèses que 1) la vitesse d'association d'un ligand sur un tissu est proportionnelle à la quantité de ligands en solution ainsi qu'à la quantité de récepteur libre et que 2) la vitesse de dissociation d'un ligand sur un récepteur ne dépend que de la quantité de complexe ligand/récepteur (LR). À l'équilibre, lorsque les vitesses de dissociation et d'association sont égales, le rapport des constantes de dissociation sur association, aussi appelé affinité à l'équilibre, est égal à la concentration de ligand lorsque la moitié des sites sont occupés. Dans son étude initiale, Clark proposa de substituer la fraction de récepteur liée par la fraction de la réponse maximale d'un tissu suite au traitement par un ligand. Ainsi, il proposa implicitement que la fraction d'occupation d'un récepteur par les ligands est égal à la fraction de la réponse maximale et que la réponse maximale provient de l'occupation de 100 % des récepteurs. Il valida son postulat

en régressant les données obtenues notamment sur l'inhibition de la contraction d'un ventricule après un traitement par l'acétylcholine (Clark, 1926). Cependant, après des années de résultats contradictoires dans la littérature, Stephenson montra la nature artéfactuelle des résultats expérimentaux obtenus par Clark en bloquant la dégradation d'acétylcholine dans le tissu et démontra que la réponse maximale dans un même tissu variait selon les ligands utilisés (STEPHENSON, 1956). Il proposa que 1) l'effet maximal d'un agoniste peut être obtenu lorsque seulement une fraction de récepteur est occupé, 2) la réponse n'est pas linéairement proportionnelle au nombre de récepteurs occupés et que 3) différents ligands peuvent avoir des capacités variables d'initiation de la réponse expliquant différentes réponses maximales observées. Du 3^e postulat naît le terme efficacité d'un ligand. Il propose aussi que les ligands ayant une efficacité partielle soient appelés des agonistes partiels et que les antagonistes soient des ligands sans efficacité appelés antagonistes compétitifs (STEPHENSON, 1956). Avec la contribution de plusieurs autres groupes de recherche, la théorie de l'occupation fut modifiée pour mieux modéliser les données expérimentales en incluant notamment une fonction décrivant la capacité du système à signaler et une constante d'efficacité intrinsèque du ligand (Kenakin, 2004). Elle se formule comme suit:

$$\frac{E}{E_{max}} = f \left[\frac{[L] \times \varepsilon [Rt]}{[L] + Kd} \right] \quad (1)$$

où

E = efficacité d'un ligand à activer un effet sur un système.

f = fonction qui décrit l'efficacité du couplage entre le stimulus et le système pour produire l'effet.

ε = efficacité intrinsèque d'un agoniste pour activer une voie de signalisation.

[L] = concentration de ligand libre.

[Rt] = concentration totale de récepteur.

Kd = constante de dissociation du ligand pour le récepteur.

Dans ce modèle, l'efficacité intrinsèque et la constante de dissociation sont des propriétés du ligand. Au contraire, les paramètres f et [Rt] sont dépendants du système

biologique étudié et doivent être déterminés afin de comparer des ligands sur différents systèmes. La plupart des concepts pharmacologiques utilisés aujourd'hui ont été postulés par les découvreurs de la théorie de l'occupation.

Modèle opérationnel

Une alternative récente à la théorie de l'occupation est le modèle opérationnel proposé en 1983 par Black et Leff. Le postulat fondamental de cette théorie reprend l'observation expérimentale en pharmacologie que la relation entre la quantité de complexe LR et l'activation d'un système n'est pas linéaire mais saturable. Pour construire leur théorie, ils expriment ce phénomène avec la fonction non linéaire la plus simple, la fonction hyperbolique rectangulaire (équation 2). Grâce à cette fonction, la facilité de couplage d'un complexe LR à une voie de signalisation se traduit par une constante de dissociation (K_e) interprétée comme la quantité de complexe LR requis pour obtenir 50% de la réponse maximale (Black and Leff, 1983):

$$\frac{E}{E_{max}} = \frac{[LR]}{[LR] + K_e} \quad (2)$$

où:

E = efficacité d'activation détectée de la voie de signalisation

E_{max} = efficacité maximale d'activation détectée de la voie de signalisation

$[LR]$ = concentration du complexe ligand/récepteur

K_e = constante de couplage du complexe LR avec la voie de signalisation.

Plus la constante K_e est petite, moins de complexes LR sont nécessaires pour induire une activité quelconque à une voie de signalisation et donc plus le couplage est efficace. La version utile de l'équation du modèle opérationnel est obtenue après substitution de (1) avec la loi d'action de masse afin d'inclure des variables pouvant être observées expérimentalement:

$$E = \frac{[L] \times [Rt] \times E_{max}}{[L]([Rt] + Kd)(Kd \times Ke)} \quad (3)$$

où

[Rt] = quantité de récepteur totale

[L] = quantité de ligand libre

Kd = constante de dissociation ligand récepteur selon la loi d'action de masse.

De cette équation, les auteurs proposent une forme pratique et simplifiée de cette équation en substituant la valeur ratiométrique τ , aussi originalement appelée ratio de transduction.

$$\tau = \frac{[Rt]}{Ke} \quad (4)$$

La substitution du ratio de transduction (4) dans (3) donne la solution finale du modèle opérationnel:

$$E = \frac{[L] \times \tau \times E_{max}}{[L](\tau + 1) + Kd} \quad (5)$$

Le ratio de transduction fait partie intégrante du modèle et n'est pas un facteur empirique ajouté *a posteriori* des postulats comme dans la théorie de l'occupation mais découle du postulat de la saturabilité de l'activité du complexe LR. De plus, τ intègre dans une même variable le potentiel de couplage d'un système avec les unités signalétiques et l'efficacité intrinsèque du ligand. Plus τ est élevé, plus un complexe LR peut activer une voie de signalisation dans un système donné. Aussi, bien que la valeur de τ varie d'un système à l'autre pour un agoniste, les valeurs relatives entre les agonistes restent constantes constituant ainsi un avantage important sur la théorie d'occupation. Le ratio de transduction peut être ainsi très utile pour comparer l'efficacité relative des agonistes (Kenakin, 2004).

Les modèles mécanistiques

Modèle à deux étapes

La notion de l'induction d'un changement conformationnel sur un récepteur par la liaison d'un ligand était implicite dans la théorie de l'occupation jusqu'à ce que Del Castillo et Katz émettent l'hypothèse que la liaison de l'acétylcholine induit un changement conformationnel sur le récepteur qui provoque la réponse du système (DEL and KATZ, 1957). Il propose, en s'inspirant fortement de la théorie enzymatique de Michaelis-Menten, qu'un ligand forme d'abord un complexe intermédiaire avec un récepteur inactif (LR). Ensuite, plus grande est la vitesse de la réaction conformationnelle du récepteur induite par le ligand, plus importante sera la quantité de complexe ligand/récepteur activé (LR*) et la réponse. Un agoniste induit facilement la transformation conformationnelle d'un récepteur alors qu'un antagoniste en est incapable. L'activation du récepteur dépend ainsi des constantes de vitesse de formation d'un complexe intermédiaire obligatoire et de sa transformation en complexe actif (figure 4, page 14 de la section introduction). Évidemment, un récepteur n'est pas une enzyme et ce modèle n'explique pas certains types de réponses comme les agonistes inverses (découverts 40 ans plus tard). Mais pour l'époque, il a la qualité d'avoir ouvert l'esprit des pharmacologues sur la nécessité d'un changement dans un récepteur après la liaison d'un agoniste pour l'activation de la réponse.

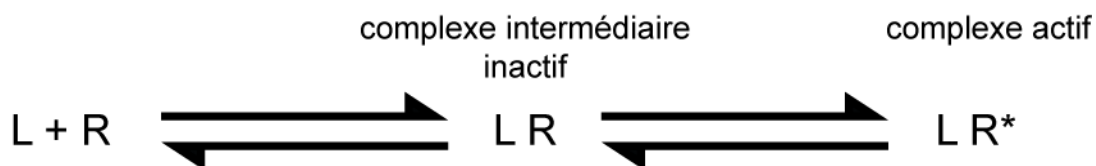


Figure 4. Modèle de Del Castillo et Katz à deux étapes. Le ligand (L) s'associe au récepteur (R) pour former un complexe intermédiaire inactif (LR). Il peut induire alors un changement conformationnel sur le récepteur menant à la formation d'un complexe actif (LR*) de manière analogue à une réaction enzymatique selon les lois de Michaelis-Menten. Figure adaptée de (DEL and KATZ, 1957).

Modèle à deux états

Le premier à proposer le modèle à deux états fut Karlin qui reprend largement les termes de la théorie de l'allostérie développée par Monod, Wyman et Changeux (Karlin, 1967; MONOD et al., 1965) en substituant l'oxygène et l'hémoglobine par le ligand et le récepteur. Le modèle à deux états propose que les récepteurs soient en équilibre entre une conformation active et inactive selon une constante d'équilibre (K_r) (figure 5, page 17 de la section introduction). Un agoniste possède une plus grande affinité pour la forme active alors que l'inverse agoniste préfère la forme inactive du récepteur. Il en découle que la liaison d'un agoniste stabilise la conformation active alors que la liaison d'un agoniste inverse stabilise la conformation inactive. Pour sa part, l'antagoniste neutre n'a pas de préférence et lie les deux états de manière équivalente. La fraction de récepteur en conformation active est décrite comme suit:

$$fR^* = \frac{Kd^* + [L]}{Kd^*(1 + K_r) + (1 + K_r Kd^* / Kd)[L]} \quad (6)$$

où

fR^* = fraction de récepteur en conformation active.

Kd^* = constante de dissociation du ligand avec la forme active.

$[L]$ = concentration du ligand.

K_r = constante d'équilibre entre les formes inactive et active des récepteurs.

Kd = constante de dissociation du ligand avec la forme inactive.

La puissance d'un ligand et son efficacité sont donc dépendantes de l'équilibre de l'oscillation entre les conformations active et inactive des récepteurs mais aussi de son affinité pour chacune des formes. Ainsi, contrairement à la théorie de l'occupation, la puissance et l'efficacité d'un ligand dans le modèle à deux états dépendent aussi de ces éléments mais selon deux relations différentes (équations 7 et 8). Tout comme dans la théorie de l'occupation, la

puissance des agonistes est une approximation de leur affinité pour les récepteurs mais seulement lorsque l'affinité pour R^* est beaucoup plus grande que pour R . Les deux théories sont très similaires pour les antagonistes neutres et la théorie de l'occupation n'explique pas les agonistes inverses. Aussi, le caractère partiel de l'efficacité d'un ligand dépend largement du ratio de ses affinités pour les deux formes de récepteurs (Kd^* et Kd). Cependant, la différence d'efficacité observée pour un même ligand entre différents systèmes ne dépend que de l'oscillation entre les formes de récepteurs (Kr).

La puissance du ligand ($EC50$) décrit par:

$$EC50 = \frac{Kd^*(1+Kr)}{1+KrKd^*/Kd} \quad (7)$$

L'efficacité maximale du ligand est décrit par:

$$fR^*max = \frac{1}{1+KrKd^*/Kd} \quad (8)$$

L'activité constitutive du récepteur est décrit par:

$$fR^*min = \frac{1}{1+Kr} \quad (9)$$

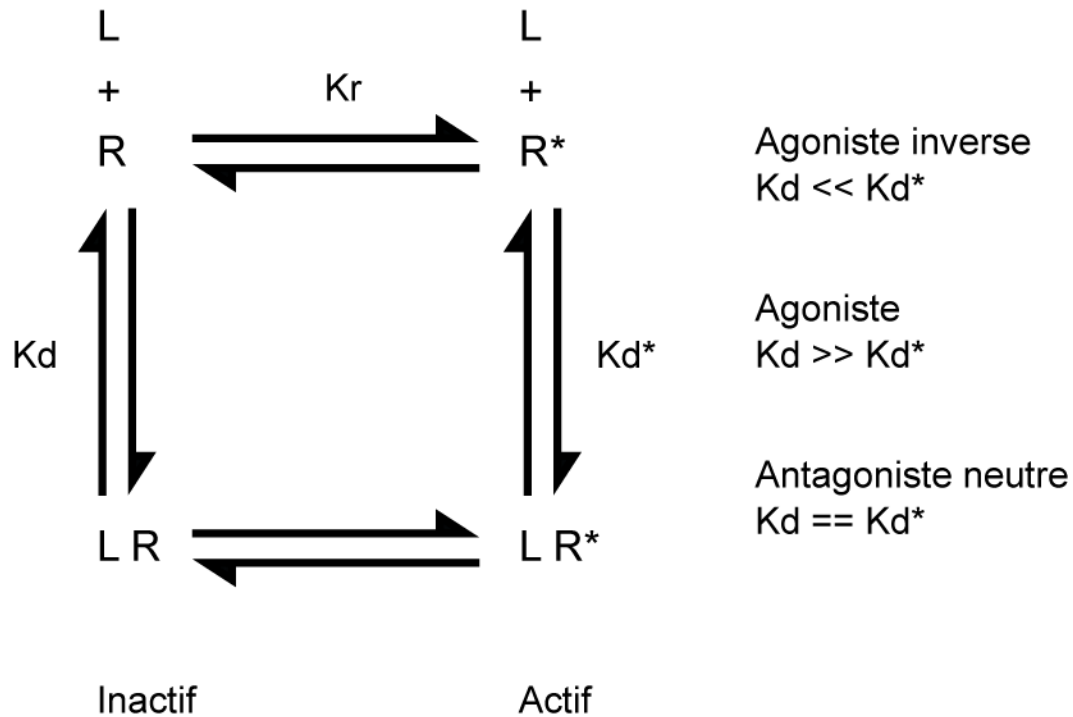


Figure 5. Modèle à deux états. Les récepteurs sont en équilibre en une forme inactive (R) et active (R*) selon une constante d'équilibre K_r . Les ligands peuvent se lier à la forme inactive selon une constante de dissociation K_d et à la forme active selon une constante de dissociation K_d^* . Les agonistes inverses se lient à R avec une plus grande affinité alors que les agonistes préfèrent R*. Les antagonistes neutres se lient aux deux formes avec la même affinité. Figure adaptée de (Leff, 1995).

Évidemment, bien que le modèle à deux états fut développé dans le contexte des récepteurs à canaux ioniques, plusieurs études ont validé son applicabilité pour les RCPGs (Leff, 1995).

Modèle du complexe ternaire simple

À la fin des années 70, plusieurs découvertes incitent au développement d'un nouveau modèle pharmacologique. D'abord, l'engagement d'effecteurs de transduction du signal avec les récepteurs stimulés par des agonistes est détecté (Ross et al., 1977). La formation de ce complexe et la réponse tissulaire peuvent être inhibées par la présence de nucléotides à base de

guanine (Ross et al., 1977; Limbird and Lefkowitz, 1978; De et al., 1980). Ensuite, un site de haute et de basse affinité pour les agonistes sont découverts dans une expérience de déplacement par un agoniste, d'antagonistes radiomarqués. Puisque le site de haute affinité est aussi sensible aux nucléotides guanines, De Lean propose que ce dernier soit un effet allostérique créé par le couplage d'un effecteur, contenant un site de liaison à nucléotide guanine, au récepteur. Ainsi, il publie le modèle du complexe ternaire qui propose que le récepteur (R) forme un complexe à l'équilibre avec le ligand (L) et le transducteur (G) décrit par les constantes de dissociation K et M respectivement (De et al., 1980)(figure 6, pages 19 de la section introduction). L'effet allostérique de la liaison du ligand sur l'engagement du transducteur et *vice versa* est décrit par le facteur sans dimension α et décrit l'efficacité d'un ligand sur le système. La réponse du système et le site de haute affinité sont les conséquences de l'engagement du transducteur au récepteur en présence d'un agoniste (LRG) formant alors un complexe ternaire. Ce modèle explique aussi l'activité constitutive du récepteur par l'engagement spontané du transducteur par le récepteur (RG) décrit par la constante de dissociation M. Il est intéressant de constater que De Léan a décrit son modèle dans un contexte où les protéines G hétérotrimériques et les RCPGs n'avait pas encore été clonés. Le modèle extrapole de manière respectable les données obtenues directement sur des préparations de tissus.

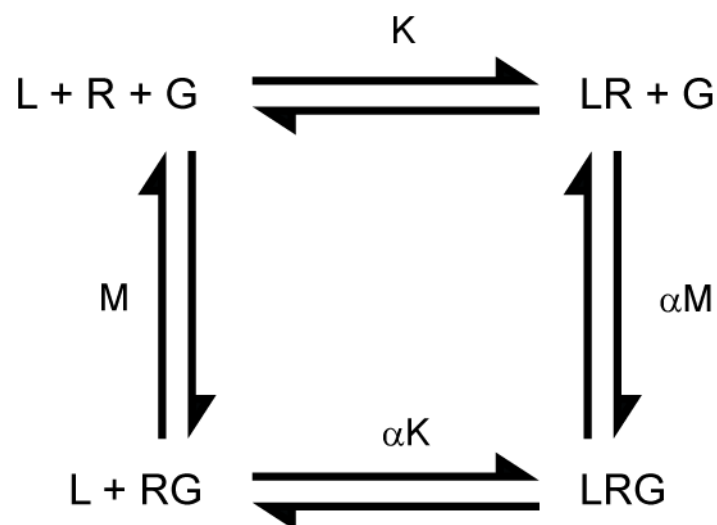


Figure 6. Modèle du complexe ternaire simple. Les récepteurs (R) forment des complexes en équilibre avec le ligand (L) et du transducteur (G). Les constantes de dissociation à l'équilibre K et M décrivent respectivement la liaison d'un ligand et de la protéine G au récepteur. Le facteur α décrit l'impact allostérique de la liaison du ligand sur l'engagement du transducteur mais aussi l'impact de l'engagement du transducteur sur la liaison du ligand. Figure adaptée de (De et al., 1980).

Modèle du complexe ternaire étendu

Durant les treize années suivantes, le clonage des RCPGs, l'identification des protéines G hétérotrimériques comme transducteur principal de la réponse et l'expression hétérologue de ces protéines dans des systèmes cellulaires simples permettent d'étendre la compréhension de la pharmacologie des RCPGs notamment avec la découverte des mutants constitutivement actifs de récepteurs et des agonistes inverses (Costa and Herz, 1989). Malheureusement, le modèle de De Léan ne peut pas expliquer les agonistes inverses. De plus, Samama montre notamment que contrairement au modèle de De Léan, l'association de la protéine G au récepteur n'est pas essentielle à la présence du site de haute affinité car ce dernier peut être détecté sur un échantillon de récepteurs constitutivement actifs purifiés en l'absence de protéines G (Samama et al., 1993). Ainsi, il propose donc de réintroduire dans le modèle de De Léan le concept de l'équilibre spontanée d'un récepteur entre une forme active (R^*) et inactive (R), à la base du modèle à deux états, qu'il renomme modèle du complexe ternaire étendu (Samama et al., 1993) (figure 7, page 20 de la section introduction). Ce concept réabilite, dans ce nouveau modèle pharmacologique, l'équilibre entre les deux états en l'absence du couplage avec les protéines G est décrit explicitement par la constante (J), (Samama et al., 1993). De plus, la liaison du ligand au récepteur est décrit par la constante de dissociation K et l'engagement de la protéine G au récepteur activé par la constante M. De plus, le modèle assume que la protéine G n'est pas engagée au récepteur inactif. Les effets allostériques de la liaison du ligand ou de la protéine G sur la formation des complexes sont inclus dans le modèle par des facteurs mis à l'échelle des constantes d'équilibres (α , β). α décrit l'impact de la liaison du ligand sur l'équilibre d'association de la protéines G au

récepteur activé et β l'impact de la liaison du ligand sur l'activation spontanée du récepteur. Il est à noter que le facteur β possède un caractère réciproque. Il décrit aussi l'impact de l'activation spontanée du récepteur sur la liaison du ligand. L'efficacité d'un ligand est expliquée par le produit de $\alpha\beta$. De la même manière que le modèle à deux états, le modèle du complexe ternaire étendu explique les antagonistes neutres, les agonistes inverses ainsi que les agonistes partiels et complets. Cependant, il explique aussi très bien la présence de sites de haute affinité. De plus, en introduisant le concept de l'activation spontanée des récepteurs, il permet d'expliquer l'efficacité des agonistes inverses, une classe de ligand découverte à la même époque (Chidiac et al., 1994; Samama et al., 1994).

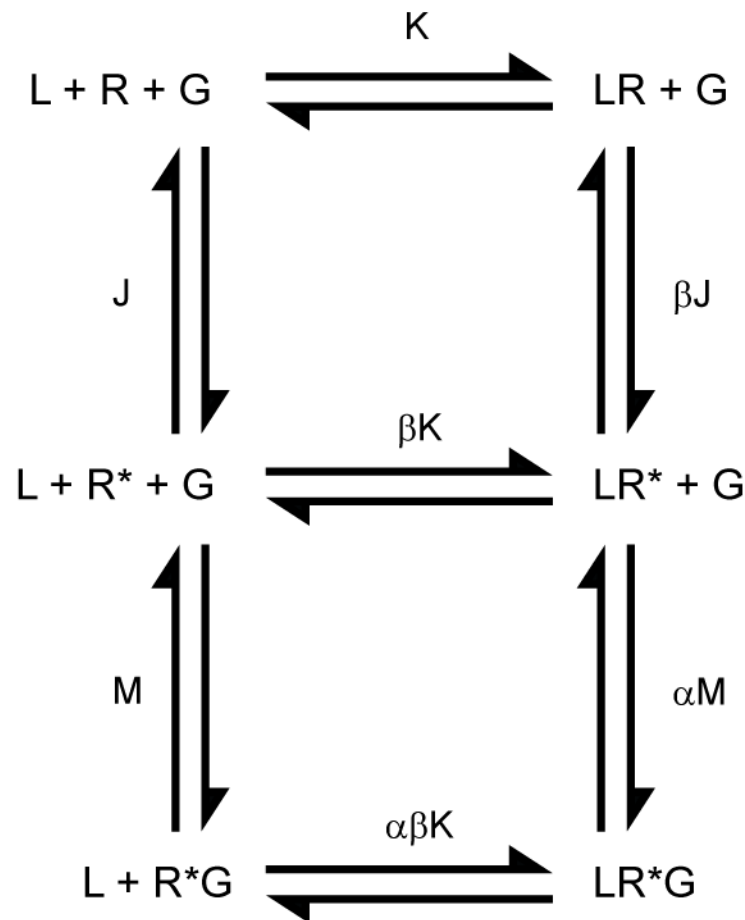


Figure 7. Modèle du complexe ternaire étendu. Les récepteurs (R) forment des complexes en équilibre avec le ligand (L) et la protéine G hétérotrimérique (G). Les constantes à l'équilibre K, M et J décrivent respectivement la liaison d'un ligand au récepteur, la liaison de la protéine G au récepteur et l'activation spontanée du récepteur. Le α décrit l'impact

allostérique de la liaison du ligand sur l'association de la protéine G au récepteur activé. Le facteur β décrit l'impact allostérique de la liaison du ligand sur l'activation spontanée du récepteur mais aussi l'impact de l'activation spontanée du récepteur sur la liaison du ligand. L'efficacité est décrite par le produit de $\alpha\beta$. Figure adaptée de (Samama et al., 1993).

Modèle du complexe ternaire cubique

Le modèle du complexe ternaire cubique reprend le modèle du complexe ternaire étendu en y incluant les complexes entre la protéine G et le récepteur inactif (Weiss et al., 1996)(figure 8, page 21 de la section introduction).

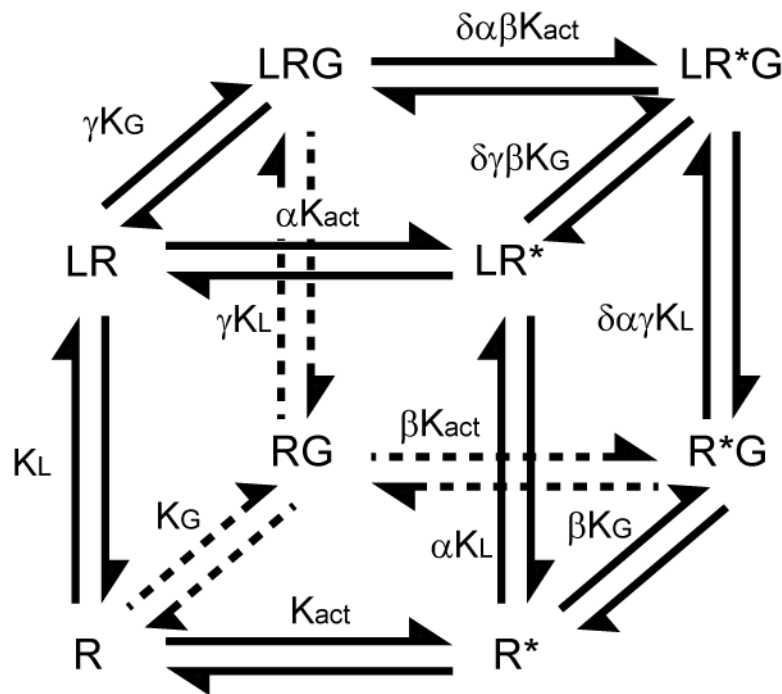


Figure 8. Modèle du complexe ternaire cubique. Similaire au modèle du complexe ternaire étendu (figure 7, page 20 de la section introduction) mais en incluant les interactions entre la protéine G et le récepteur inactif. Figure adaptée de (Weiss et al., 1996)

Signalisation multidimensionnelle (biaisée)

Dans tous les modèles mécanistiques présentés précédemment, la notion qu'un seul état actif du récepteur existe et est responsable de la réponse du système, est implicite. Ainsi, l'efficacité d'un ligand devrait être la même dans toutes les voies de signalisation observées et la classification d'un ligand se détermine généralement par son efficacité mesurée dans la voie des protéines G hétérotrimériques. Or, la découverte que certains agonistes inverses sur la voie des protéines G hétérotrimériques pouvaient être des agonistes pour l'activation des protéines kinases activées par des signaux mitogéniques (MAPK), dans ce cas, une voie indépendante de l'activation des protéines G hétérotrimériques mais dépendante de l'engagement au récepteur de l'effecteur β arr, a démontré que l'efficacité des ligands pouvait être différente pour chaque voie de signalisation (Azzi et al., 2003; Galandrin and Bouvier, 2006). L'efficacité d'un ligand est donc multidimensionnelle et sa classification doit tenir compte de son efficacité sur chacune des voies de signalisation engagées. Un ligand peut être biaisé et favoriser une voie de signalisation au détriment d'une autre (Galandrin and Bouvier, 2006; Wei et al., 2003; Gesty-Palmer et al., 2006). Conséquemment, les récepteurs doivent exister en plusieurs états conformationnels dont certains sont stabilisés par la liaison d'un ligand menant spécifiquement à l'engagement d'effecteurs et l'activation de leur voie de signalisation (Galandrin et al., 2008; Galandrin et al., 2007). Plusieurs études biochimiques et biophysiques sur les récepteurs ont aussi montrées l'existence de plusieurs conformations actives sur des RCPGs (Seifert et al., 1999; Seifert et al., 2001; Galandrin et al., 2008; Galandrin et al., 2007; Galandrin and Bouvier, 2006; Gales et al., 2006; Gether et al., 1995; Ghanouni et al., 2001; Peleg et al., 2001; Swaminath et al., 2005; Swaminath et al., 2004; Georgieva et al., 2008; Vilardaga et al., 2005; Granier et al., 2007; Zurn et al., 2009; Pellissier et al., 2009). En accord avec l'existence de différents états associés aux voix de signalisation, certaines études décrivent des mutants de récepteurs dont l'activité est biaisée pour certaines voies de signalisation (Wei et al., 2003; Shenoy et al., 2006; Barroso et al., 2002; Perez et al., 1996). De plus, pour le récepteur α 1B-adrénergique (α 1BAR), certaines de ces mutations augmentent l'affinité d'un ensemble restreint d'agonistes indiquant l'existence de plusieurs conformations actives de récepteur induisant des sites de haute affinité (Perez et al., 1996).

Modèle probabiliste

Le modèle probabiliste inclut la possibilité qu'un ensemble de récepteur puisse adopter plusieurs conformations actives (figure 9, page 24 de la section introduction). Ainsi, ce modèle postule qu'en l'absence de ligand, un ensemble de récepteurs adopte une distribution d'états conformationnels ayant chacun une efficacité distincte sur une voie de signalisation. L'efficacité détectée sur cette voie est la moyenne des différentes conformations actives pondérée par leur abondance relative et leur l'efficacité intrinsèque. La distribution est modifiée par la liaison d'un ligand ou l'engagement d'un effecteur au récepteur. Un ligand stabilisant une distribution contenant des conformations plus actives ou plus de conformations actives par rapport à la distribution de conformations du récepteur à l'état basal est un agoniste pour la voie considérée. Au contraire, un ligand stabilisant une distribution contenant des conformations moins actives ou en contenant moins sera un agoniste inverse. L'antagoniste neutre ne changera pas l'efficacité détectée sur une voie par rapport à l'efficacité basale (Onaran and Costa, 1997) mais peut changer la distribution. Ce modèle utilise la mécanique statistique, théorie dont se servent les physico-chimistes depuis 40 ans pour prédire les propriétés macroscopiques de petites molécules, pour décrire en des termes physiques rigoureux la pharmacologie des RCPGs. L'avantage sur les autres modèles est que des paramètres thermodynamiques peuvent être calculés d'un ensemble de conformations connues. Il s'applique aussi à tout autre phénomène allostérique induit par la liaison d'un ligand sur une protéine (Onaran and Costa, 2009).

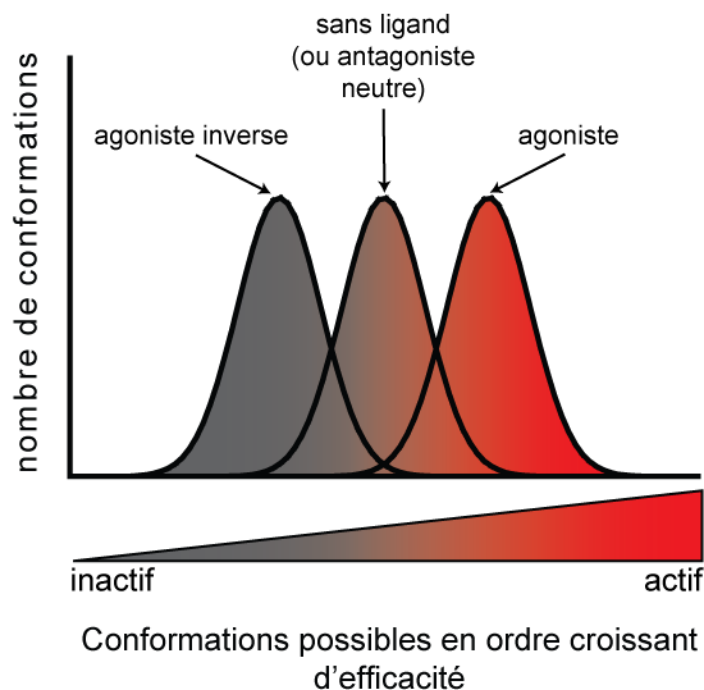


Figure 9. Modèle probabiliste. Exemple de trois distributions gaussiennes de conformations. À l'état basal, les récepteurs adoptent un ensemble de conformations dont une fraction est plus ou moins active considérant une voie de signalisation. Les agonistes stabilisent une distribution contenant des conformations plus actives et/ou plus de conformations actives. Les agonistes inverses font le contraire. Les antagonistes neutres ne change pas l'efficacité macroscopique, présumément en n'affectant pas la distribution.

Le modèle probabiliste est très difficile à utiliser et probablement encore plus dans le contexte de l'analyse de la signalisation multidimensionnelle limitant ainsi son utilité. Conséquemment, les anciens modèles mécanistiques comme le modèle ternaire étendu demeurent populaires pour l'analyse intuitive de la signalisation. Plus récemment, une extension du modèle opérationnel décrit plus haut dans la thèse a été proposée par le groupe du Dr Christopoulos et pourrait s'avérer très utile pour la description quantitative du biais de l'efficacité d'un ligand, au moins pour les agonistes (Kenakin et al., 2012). De plus, les récentes avancées techniques de la biochimie structurale des protéines membranaires permettent de mieux comprendre la nature des changements allostériques lors de l'activation des RCPGs et du couplage avec des effecteurs (Audet and Bouvier, 2012) (annexe 2, page iii

de la section annexe). Ces nouveaux outils auront certainement un impact sur le raffinement de la théorie pharmacologique des RCPGs. Le prochain chapitre présente les principaux effecteurs des RCPGs.

Les effecteurs principaux des RCPGs

Protéines G hétérotrimériques

Généralités

La liaison d'un agoniste à un RCPG induit un signal allostérique qui est transmis par le domaine transmembranaire du récepteur vers sa partie intracellulaire. Il en résulte l'engagement et l'activation de plusieurs effecteurs dont les membres de la grande famille des protéines régulées par les nucléotides de type guanosine, les protéines G hétérotrimériques (figure 10, page 31 de la section introduction). Premiers effecteurs des RCPGs à être identifiés, ils forment à l'état inactif un hétérotrimère composé d'une sous-unité alpha ($G\alpha$), lié au guanosine diphosphate (GDP), et les sous-unités bêta ($G\beta$) et gamma ($G\gamma$), qui forment un dimère stable considéré comme une même unité fonctionnelle, $G\beta\gamma$ (figure 11, page 39 de la section introduction) (Ross et al., 1977; Limbird and Lefkowitz, 1978; De et al., 1980; Gilman, 1987). En présence d'agonistes, les récepteurs agissent comme facteurs d'échange des nucléotides (GEF) en engageant le complexe hétérotrimérique et favorisant la relâche du GDP de la sous-unité $G\alpha$. Ensuite, le guanosine-tri-phosphate (GTP), plus abondant que le GDP, prend la place du GDP dans la sous-unité $G\alpha$. Une fois actives, les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ s'associent à d'autres effecteurs pour les réguler et provoquer l'activation d'une cascade d'amplification de la signalisation. Ces effecteurs secondaires sont souvent des enzymes qui catalysent la production des seconds messagers, des petites molécules affectant l'activité d'une vaste panoplie d'autres effecteurs impliqués dans le contrôle de divers phénomènes cellulaires. L'arrêt de la signalisation se produit lorsque le GTP lié la protéine G est hydrolysé en GDP par l'activité GTPasique intrinsèque des sous-unités $G\alpha$. Les protéines G hétérotrimériques constituent donc une courroie de transmission proximale majeure pour la signalisation des RCPGs.

Signalisation des sous-unités G α

Les humains expriment plus 15 sous-unités G α , excluant les variants d'épissage, réunis en 4 familles selon leur homologie de séquence: G $_s$, G $_{i/o}$, G $_q$ et G $_{12/13}$ (Downes and Gautam, 1999; Simon et al., 1991)(tableau I, page 30 de la section introduction). La signalisation induite par les sous-unités G α diffère pour chaque famille. Les membres de la famille G $_s$ (G $_s$ et G $_{olf}$, une G α engagée par les récepteurs olfactifs) stimulent les enzymes membranaires adénylate cyclase dont la fonction est de catalyser la conversion d'adénosine tri-phosphate en AMPc. Ce second messenger lie et régule la protéine kinase dépendante du cAMP (PKA) qui va phosphoryler plusieurs cibles cellulaires dont les RCPGs, mais aussi plus d'une trentaine de protéines comme des protéines kinases, phosphatases, les protéines d'échafaudages, des protéines du cytosquelette, des facteurs impliqués dans l'ubiquitination ainsi que la signalisation cytoplasmique et nucléaire (Smith et al., 2011). Une autre cible importante activée par l'AMPc sont les facteurs d'échange du nucléotide guanosine dépendant de l'AMPc, EPAC1 et EPAC2, qui vont ensuite activer les petites protéines G monomériques apparentées à Ras, RAP1 et RAP2. Ces dernières vont transmettre l'action des EPAC sur la signalisation en régulant notamment les fonctions cardiaques, vasculaires, neuronales, rénales, inflammatoires et la sécrétion d'insuline (Grandoch et al., 2010; Gloerich and Bos, 2010).

Au contraire de G $_s$, certains des membres de la famille G $_{i/o}$ (G $_{i1}$, G $_{i2}$, G $_{i3}$, G $_o$ et G $_z$) inhibent la production d'AMPc par l'adénylate cyclase. Une autre sous-unité G $_i$, impliquée dans la transduction du goût sucré, amer et umami, la gustducine, diminue aussi la concentration d'AMPc intracellulaire présumément en activant des phosphodiésthérases (Kinnamon, 2012). Cependant, il est à noter que la transduction du goût dans les cellules de bourgeons gustatifs dépend largement de l'activation de G $\beta\gamma$ (Finger and Kinnamon, 2011). Le dernier membre de cette famille, la transducine (G $_t$), active aussi une phosphodiésthérase pour contrôler le niveau de second messenger cellulaire. Exprimée notamment dans le *rod outer segment* des cellules de pigments visuels de la rétine et activée suite à la captation d'un photon par le récepteur rhodopsine, la sous-unité G $_t$ va lier et activer la phosphodiésthérase de type 6 (PDE6) qui catalyse la transformation du guanosine mono-phosphate cyclique (GMPc) en

guanosine mono-phosphate (GMP). La baisse de concentration de GMPc ferme subitement les canaux échangeurs de sodium/calcium contre potassium entraînant une hyperpolarisation de la membrane plasmique et l'activation du neurone visuel (Ridge et al., 2003).

Classiquement, les membres de la famille G_q (G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15}) activent les $PLC\beta$ qui catalysent la conversion de phosphatidylinositol-4-5-diphosphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAC) et inositol-tri-phosphate (IP3) menant à l'activation des protéines kinase C (PKC) et à l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire respectivement (Morris and Scarlata, 1997). En plus du couplage direct avec les phospholipase C de type β ($PLC\beta$), au moins deux membres de cette famille de sous-unités $G\alpha$ (G_q , G_{11}) interagissent directement avec p63-RhoGEF pour augmenter l'activité des petites protéines G monomériques RhoA, RhoB et RhoC impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires comme la formation de fibre de stress d'actine, la prolifération, la croissance, la migration, la polarité et la différenciation cellulaire, la dynamique des microtubules, les voies de transport membranaire et l'activation de facteurs de transcription (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Lutz et al., 2007; Rojas et al., 2007; Lutz et al., 2005). De plus, deux autres effecteurs de G_q contenant un domaine RhoGEF, Duet et Trio, sont impliqués dans l'activation de RhoA par G_q . Plus particulièrement, l'activation de RhoA par Trio/ G_q est important pour la locomotion et la croissance de l'organisme *C.elegans* (Williams et al., 2007; Mizuno and Itoh, 2009).

Les membres de la famille $G_{12/13}$ (G_{12} et G_{13}) activent aussi la petite protéine RhoA mais en liant les RhoGEFs p115-rho-GEF, PDZ-RhoGEF et la RhoGEF associée à la leucémie (LARG) (Hart et al., 1998; Fukuhara et al., 1999; Fukuhara et al., 2000; Kurose, 2003; Kelly et al., 2007). De plus, les sous-unités G_{12} et G_{13} s'associe à plus de 20 autres facteurs dont des protéines phosphatases, les cadherines ainsi que certaines protéines d'ancrage de la kinase A (AKAP). Cependant, bien que les $G_{12/13}$ soient associés à des rôles physiologiques et pathophysiologiques comme la promotion de l'invasion des cellules cancéreuses, l'agrégation plaquettaire, l'hypertrophie cardiaque ou la différenciation neuronale, l'importance biologique de la plupart des nouveaux partenaires de $G_{12/13}$ restent à déterminer (Kelly et al., 2007).

Signalisation des sous-unités Gβγ

L'humain exprime 5 sous-unités Gβ et 12 sous-unités Gγ (Downes and Gautam, 1999). En plus d'inhiber l'activité GTPasique spontanée des sous-unités Gα, les complexes Gβγ lient et régulent l'activité de plusieurs protéines effectrices comme des canaux ioniques, certains isoformes d'adénylate cyclase (Sunahara et al., 1996), des PLCβ (Zhang et al., 1996) et la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) (Krugmann et al., 1999; Leopoldt et al., 1998; Stephens et al., 1994) menant à l'activation de voies signalétiques associées (Wettschureck and Offermanns, 2005). Par exemple, Gβγ régule les canaux potassiques muscariniques entrants et rectifiants (IKACH) dans le tissu cardiaque (Wickman and Clapham, 1995) mais aussi inhibe les canaux calciques entrants activés par le potentiel cellulaire de type 2 (Ca_v2) par sa liaison avec la sous-unité α1 (Currie, 2010). Aussi, la transduction du goût dans les cellules de bourgeons gustatifs dépend largement de l'activation de la phospholipase C β2 (PLCβ2) induite par son interaction avec Gβγ. L'augmentation de la concentration d'inositol triphosphate (IP3) produit par la PLC va provoquer la libération du calcium intracellulaire activant ainsi le canal au cation monovalent TrpM5 qui dépolarise la membrane cellulaire (Finger and Kinnamon, 2011). En plus de ces effecteurs classiques, un nombre croissant de nouveaux effecteurs régulés par une interaction directe avec le complexe Gβγ sont découverts chaque année (Dupre et al., 2009; Smrcka, 2008). Ainsi, les complexes Gβγ jouent un rôle aussi important que les sous-unités Gα pour l'activation de la signalisation des RCPGs.

Modifications lipidiques des sous-unités

La plupart des sous-unités des protéines G hétérotrimériques sont modifiées par l'ajout de lipides et cette modification post-traductionnelle est importante pour leur localisation membranaire et leur activité (Chen and Manning, 2001). Toutes les sous-unités Gα, sauf celle de la transducine, sont modifiées par l'ajout d'un palmitate à une cystéine de l'extrémité N-terminale à l'aide notamment des enzymes de transfert de palmitate DHHC3 et DHHC7 (Tsutsumi et al., 2009). La sous-unité Gα de la transducine est plutôt N-acétylée de manière hétérogène par l'ajout de lauréate, de myristate, ainsi que plusieurs de ses formes insaturées

(Neubert et al., 1992). En plus du palmitate, les sous-unités de la famille $G_{i/o}$ ont un myristate présent sur une glycine présente à l'extrémité N-terminale. Contrairement à la myristoylation, la palmitoylation est réversible et dépend de l'état d'activation du complexe hétérotrimérique. Ainsi, la liaison du GTP et l'activation des sous-unités $G\alpha$ entraînent leur dépalmitoylation alors que leur inactivation favorise la palmitoylation. Pour leur part, toutes les sous-unités $G\gamma$ sont isoprénylées grâce à un motif CAAX à leur extrémité C-terminale. Plus particulièrement, les sous-unités $G\gamma 1, 8$ et 11 possèdent un farnesyl et les autres un géranylgénaryl (Zhang and Casey, 1996).

Tableau I. Liste des différentes sous-unités des protéines G hétérotrimériques.

Noms	Gènes	Expression	Exemple d"effecteurs	
Sous-unités Gα				
Famille Gα _s				
Gα _s	GNAS	Ubiquitaire	↑ toutes les AC	
Gα _{olf}	GNAL	Épithélium olfactif, cerveau	↑ AC	
Famille Gα _{i/o}				
Gα _{i1}	GNAI1	Largement distribué	} ↓ ACI, III, V, VI, VIII, IX	
Gα _{i2}	GNAI2	Ubiquitaire		
Gα _{i3}	GNAI3	Largement distribué		
Gα _o	GNAO	Neurones	↓ ACI	
Gα _z	GNAZ	Neurones, plaquettes	↓ ACV, VI, ↑ RAPIGAP	
Gα _{gust}	GNAT3	Cellule du goût	↑ PDE	
Gα _{t-r}	GNAT1	Bâtonnets de la rétine	↑ PDE6	
Gα _{t-c}	GNAT2	Cônes de la rétine	↑ PDE6	
Famille Gα _{q/11}				
Gα _q	GNAQ	Ubiquitaire	} ↑ PLCβ1-4, ↑ p63-RhoGEF	
Gα ₁₁	GNAI1	Ubiquitaire		
Gα ₁₄	GNAI4	Reins, poumons, foie	} ↑ PLCβ1-4	
Gα ₁₅	GNAI5	Cellules hématopoïétiques		
Famille Gα _{12/13}				
Gα ₁₂	GNAI2	Ubiquitaire	↑ PDZ-RhoGEF, ↑ LARG	
Gα ₁₃	GNAI3	Ubiquitaire	↑ PDZ-RhoGEF, ↑ LARG, ↑ p115RhoGEF	
Sous-unités Gβ				
β ₁	GNB1	Largement distribué, bâtonnets	} ↓ ACI, III, V, VI	
β ₂	GNB2	Largement distribué		
β ₃	GNB3	Largement distribué, cônes		
β ₄	GNB4	Largement distribué		
β ₅	GNB5	Cerveau		
Sous-unités Gγ				
γ ₁	GNGT1	Bâtonnets, cerveau	↑ GRK2-GRK3	
γ ₂	GNG2	Largement distribué	} ↑ PI3K	
γ ₃	GNG3	Cerveau, cellules sanguines		
γ ₄	GNG4	Largement distribué		
γ ₅	GNG5	Largement distribué		
γ ₇	GNG7	Largement distribué		
γ ₈	GNG8	Épithélium olfactif		
γ ₁₀	GNG10	Largement distribué		
γ ₁₁	GNG11	Largement distribué		
γ ₁₂	GNG12	Largement distribué		
γ ₁₃	GNG13	Cerveau, bourgeons olfactifs		
γ ₁₄	GNGT2	Cônes, cerveau		
				↓ VDCC de type T (Ca _v 3.2)
				↓ VDCC de type N, P/Q, R (Ca _v 2.1-2.3)
				(pour Gβ ₂ γ ₂)

AC, adénylate cyclase; RAPIGAP, protéines d'activation de l'activité GTPasique RAPI; PDE, phosphodiesterase; PLC, phospholipase C; RhoGEF, facteur d'échange de la guanine de Rho; LARG, RhoGEF associée à la leucémie; GIRK, canal potassique rectifiant entrant régulé par les protéines G; GRK, kinase des RCPG; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; VDCC, canal calcique dépendant du voltage; Tableau adapté de Wettschureck et Offermanns(Wettschureck and Offermanns, 2005).

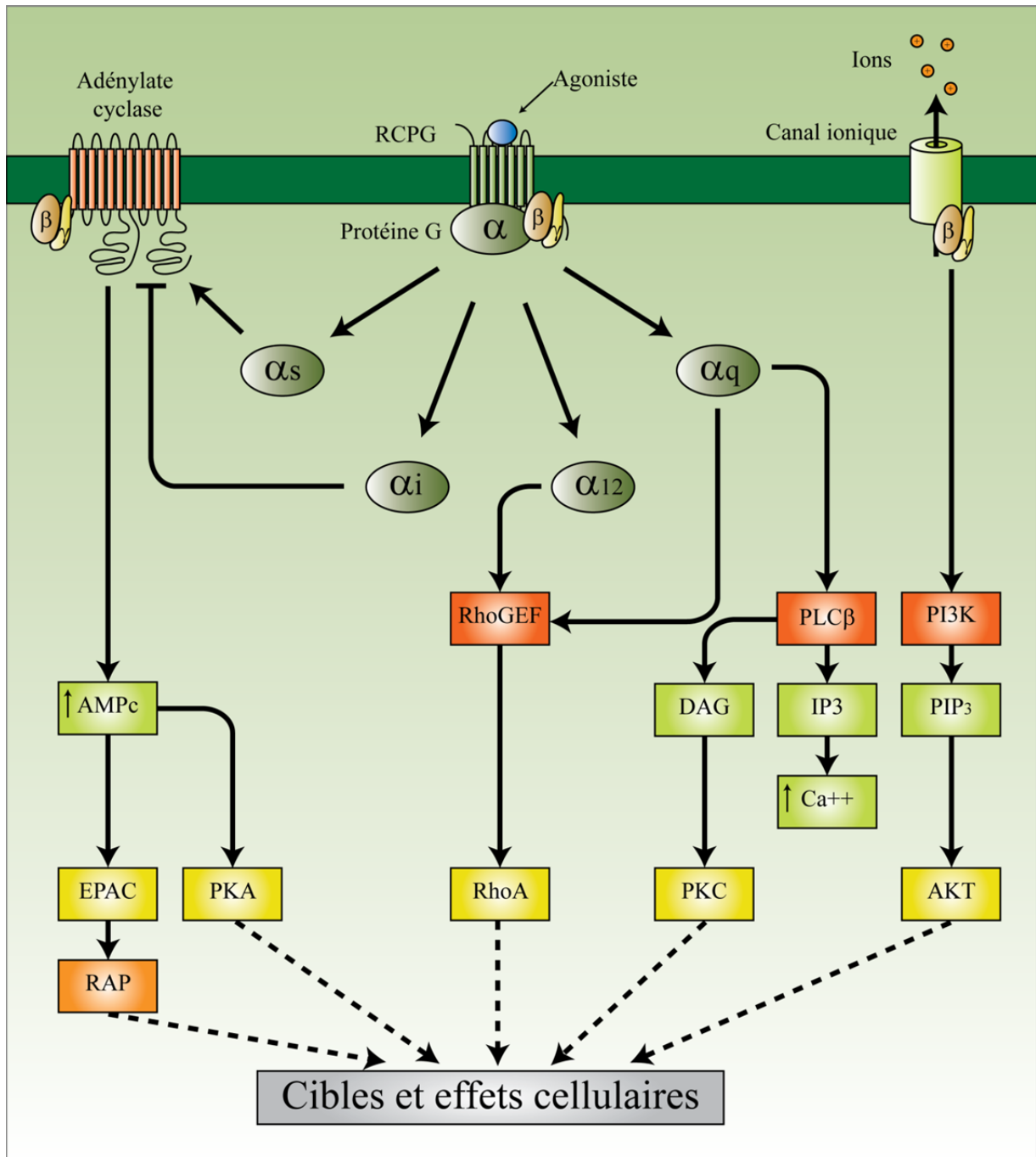


Figure 10. Signalisation médiée par protéines G hétérotrimériques. Les familles de sous-unités Gα et les sous-unités Gβγ activent des cascades de voies de signalisation qui leur sont propres en engageant spécifiquement différents effecteurs (en rouge). Souvent ces derniers sont des enzymes catalysant la production de seconds messagers (en vert) qui active à leur tour d'autres effecteurs en aval de la cascade (en jaune).

Structure tridimensionnelle

Les sous-unités $G\alpha$ ont une masse moléculaire entre 39 et 52 kDa et sont constituées de deux domaines structuraux principaux, un domaine hélical et un domaine GTPasique (Oldham and Hamm, 2006) reliés par deux jonctions (figure 11a, page 39 de la section introduction). Le domaine hélical est composé de six hélices α et recouvre le site de liaison du nucléotide du domaine GTPasique. Pour sa part, le domaine GTPasique comprend sept hélices α formant des jonctions de type *crossovers* pour un feuillet β composé de 5 brins parallèles et 1 brin antiparallèle. Par ailleurs, ce repliement est conservé chez les autres membres de la famille des protéines G comme les petites protéines G monomériques et est très important pour la fonction des sous-unités $G\alpha$ car il définit le site catalytique de l'hydrolyse du GTP en GDP et les interfaces d'interaction avec le complexe $G\beta\gamma$, les récepteurs et les effecteurs de signalisation (figure 11a, page 39 de la section introduction).

Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ ont une masse moléculaire d'environ 36 et 8 kDa respectivement. La sous-unité $G\beta$ a deux domaines, une hélice α à l'extrémité N-terminale et un domaine replié en *β -propeller* à 7 lames induit par la présence dans la séquence protéique de sept motifs répétés de type WD40. Plus petite, la sous-unité $G\gamma$ est constituée de deux hélices α formant un dimère indissociable avec $G\beta$. Dans ce complexe, les hélices N- et C-terminales de $G\gamma$ interagissent respectivement avec la queue N-terminale (interaction de type *coil-coil*) et les lames 5 et 6 de la sous-unité $G\beta$ (Wall et al., 1995; Schmidt et al., 1992). Lié au GDP, la sous-unité $G\alpha$ forme un hétérotrimère avec le complexe $G\beta\gamma$ dont l'interface est constitué des régions N-terminal et *switch I/II* de la sous-unité $G\alpha$ et du domaine *β -propeller* de la sous-unité β (Lambright et al., 1996) (figure 11b, page 39 de la section introduction).

Mécanisme d'activation

Originellement, les études sur des membranes et protéines purifiées considéraient les protéines G hétérotrimériques comme des effecteurs diffusant librement dans la membrane plasmique ne reconnaissant que des récepteurs activés (Tolkovsky and Levitzki, 1978). Au contraire, le développement des technologies de transfert d'énergie de résonance a permis d'apporter des preuves, directement dans des modèles cellulaires en culture, que les protéines

G peuvent être pré-couplées au récepteur. Par exemple, l'association basale de la protéine $G_{\alpha_1\beta_1\gamma_2}$ au récepteur α_2 -adrénergique (α_2AR) est observée en l'absence d'agoniste dans des cellules HEK293 (Gales et al., 2006)(annexe 3, page iv de la section annexe). Par ailleurs, ces observations sont en accord avec la grande affinité *in vitro* des protéines G hétérotrimériques pour les récepteurs à l'état basal comme la transducine pour la rhodopsine (64 nM) ou le récepteur aux opiacés de type δ (δOR) et la protéine G_o (20 nM) (Alves et al., 2003).

L'activation d'un récepteur induit une transition allostérique activatrice dans le complexe hétérotrimérique provoquant l'échange du GDP pour le GTP dont les conséquences sont une dissociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ les libérant d'un complexe transitoire avec le récepteur (Janetopoulos et al., 2001; Gilman, 1987), ou à tout le moins un réarrangement conformationnel des partenaires hétérotrimériques dans un complexe pré-associé avec le récepteur et persistant (Gales et al., 2006; Bunemann et al., 2003). Dans tous les cas, la séparation de la sous-unité $G\alpha$ du complexe $G\beta\gamma$ est fortement suggérée par l'étude des structures cristallines des protéines G hétérotrimériques. D'abord, la présence du GTP (Lambright et al., 1994; Mixon et al., 1995) à la place du GDP (Noel et al., 1993; Coleman et al., 1994) provoque un changement conformationnel perturbateur important dans les régions *switch I/II* au coeur de la surface d'interaction entre $G\alpha$ et $G\beta$ (Wall et al., 1995; Lambright et al., 1994; Lambright et al., 1996). Ensuite, cette même interface est utilisée pour l'engagement de certains effecteurs directs des protéines G hétérotrimériques comme l'adénylate cyclase (AC) ou du la kinase des RCPGs de type 2 (GRK2) (Tesmer et al., 2000; Lodowski et al., 2003). Toutefois, en accord avec l'hypothèse de la formation d'un complexe de signalisation stable et pré-associé, la séparation des sous-unités n'implique pas nécessairement leur dissociation du complexe signalétique. Par exemple, lorsque GRK2 est recrutée au complexe $G_qG\beta\gamma$, elle s'insère entre G_q et $G\beta\gamma$ et offre les nouvelles interfaces d'association afin de maintenir les sous-unités des protéines G dans un même complexe malgré leur séparation physique (Tesmer et al., 2005). La présence ou non d'effecteurs échafaudant les protéines G dans les modèles étudiés pourrait expliquer les résultats soutenant une dissociation ou un changement conformationnel du complexe hétérotrimérique. D'ailleurs, il n'est pas exclu que les deux modèles cohabitent dans des événements dynamiques. Par exemple, il est probable qu'un récepteur activé pré-couplé à G_q provoque la dissociation de $G_q/G\beta\gamma$ et qu'ensuite $G\beta\gamma$

recrute GRK2 pour reformer un complexe avec Gq au récepteur. Le temps de vie des états intermédiaires avec des partenaires dissociés par rapport à l'état avec des partenaires dans un complexe détermine alors l'interprétation des résultats obtenus à l'équilibre.

Pour les petites protéines G monomériques, l'étape limitante de la réaction d'échange des nucléotides dans une protéine G se fait par l'intermédiaire d'un facteur GEF qui induit une transition conformationnelle sur le site de liaison du GDP réduisant son affinité (Bos et al., 2007). Il s'ensuit un état transitoire de la protéine G sans nucléotide qui se termine par la diffusion et la liaison du GTP au site catalytique. Cependant, plusieurs éléments laissaient croire que le mécanisme d'échange serait différent pour les protéines G hétérotrimériques. En effet, le récepteur est trop loin du site de liaison du GDP pour agir directement. De plus, contrairement aux petites protéines G monomériques, la présence du domaine hélical adjacent au site GTPasique masque les voies d'entrées et de sorties des nucléotides au site catalytique (figure 11a, page 39 de la section introduction). Aussi, un facteur supplémentaire, le complexe $G\beta\gamma$, est essentiel pour la transmission de l'activité GEF du récepteur (Hekman et al., 1984; Fung, 1983). Ainsi, deux hypothèses impliquant l'action allostérique du complexe $G\beta\gamma$ sur la sous unité $G\alpha$ ont été formulées pour décrire le mécanisme d'échange des nucléotides dans le complexe hétérotrimérique. L'hypothèse du *lever arm*, inspiré par l'étude biochimique des mutations des protéines G hétérotrimériques produisant des phénotypes pathologiques, propose que l'échange des nucléotides dans la sous-unité $G\alpha$ est favorisé par une légère inclinaison du complexe $G\beta\gamma$ qui agit alors comme un bras de levier induisant une distortion de la région *switchII* ce qui ouvre une voie d'accès pour le site de liaison des nucléotides (Rondard et al., 2001; Iiri et al., 1998). Au contraire, le modèle du *gear shift* propose que l'échange GDP pour le GTP soit plutôt le résultat d'une rotation du complexe $G\beta\gamma$ dans le site de liaison du GDP forçant l'ouverture du domaine hélical et permettant le libre accès des nucléotides (Cherfils and Chabre, 2003). L'ouverture du domaine hélical lors de l'activation des protéines G par un récepteur fut supportée par une étude biophysique détectant la proximité entre un marqueur luminescent fusionné à différents endroits dans le domaine hélical de G_i , et un autre fusionné à la queue C-terminale du récepteur $\alpha 2AR$ (Gales et al., 2006)(annexe 3, page iv de la section annexe). Dans cette étude, la direction du signal de proximité change en fonction des positions du marqueur sur le domaine hélical suggérant un

mouvement relatif de ce dernier par rapport à la queue C-terminale du récepteur. Récemment, d'autres études biophysiques utilisant la microscopie électronique (Westfield et al., 2011) et la spectrométrie de masse (Chung et al., 2011) ont aussi confirmé le mouvement du domaine hélical en l'absence de nucléotide et lorsque le complexe hétérotrimérique est associé à un récepteur. Cependant, la démonstration la plus éloquente de cette hypothèse est survenue par la publication récente de la structure cristalline du complexe hétérotrimérique $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$ dans l'état de transition en l'absence de nucléotides et en complexe avec le β_2AR en conformation active (Rasmussen et al., 2011b). Dans cette structure, le domaine hélical effectue une rotation d'environ 130° par rapport à sa position dans les structures liées aux nucléotides libérant l'accès permettant l'échange des nucléotides (Audet and Bouvier, 2012)(annexe 2, page iii de la section annexe)(figure 11, page 39 de la section introduction). En accord avec l'importance du complexe $G\beta\gamma$ dans l'activation de $G\alpha$, le domaine hélical est maintenant parallèle au plan de la membrane et interagit avec une boucle de la sous-unité $G\beta$. Cependant, contrairement à la prédiction du modèle du *gear shift*, la position du complexe $G\beta\gamma$ par rapport au domaine GTPasique de la sous-unité $G\alpha$ est très similaire à celle retrouvée dans les complexes hétérotrimériques liés au GDP. Il est fort probable que dans cette structure, la stabilisation de l'interaction entre $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ par un anticorps utilisé pour favoriser la cristallisation du complexe affecte la position des sous-unités dans le complexe. Ainsi, d'autres structures sont requises pour comprendre pleinement le mécanisme de l'activité GEF du récepteur.

Couplage au RCPG

Plusieurs études démontrent que le couplage de la protéine G hétérotrimérique au récepteur activé se fait principalement par la queue C-terminale de la sous-unité $G\alpha$ (Blahos et al., 1998; Kostenis et al., 1997c; Kostenis et al., 1997a; Conklin et al., 1996; Natochin et al., 2000). Par exemple, un peptide comprenant les onze derniers acides aminés de ce domaine est suffisant pour déplacer la liaison de la transducine WT de la rhodopsine et stabiliser la métarhodopsine II (Hamm et al., 1988; Aris et al., 2001). De plus, le couplage des protéines G de la famille $G\alpha_i$ est inhibé par l'ajout d'une molécule d'ADP-ribose, catalysé par la toxine de la pertussis, sur la cystéine de la queue C-terminale de la sous-unité $G\alpha$ (West, Jr. et al., 1985).

En fait, le C-terminal de la sous-unité $G\alpha$ s'insère dans une cavité formée lors de l'activation des récepteurs et située entre les hélices transmembranaires III, V, VI et VII (Janz and Farrens, 2004; Scheerer et al., 2008; Rasmussen et al., 2011b). De plus, la queue C-terminale de la sous-unité $G\alpha$ est importante dans la sélectivité de couplage des protéines G. Par exemple, la substitution de trois résidus dans la G_q par ceux retrouvés dans la G_{i2} est suffisant pour que le récepteur à la dopamine de type 2 (D2R) et le récepteur à l'adénosine de type 1 (A1R), qui n'engagent normalement que G_i , se couplent aussi à la G_q (Conklin et al., 1993).

Des études suggèrent que d'autres domaines de la sous-unité $G\alpha$ proches de la membrane plasmique comme la queue N-terminale (Kostenis et al., 1997b; Kostenis et al., 1998), la jonction 1 (Heydorn et al., 2004b), l'hélice $\alpha 4$ (Bae et al., 1999), les boucles reliant l'hélice αN et le brin $\beta 1$ (αN - $\beta 1$) (Blahos et al., 2001), l'hélice $\alpha 2$ et le brin $\beta 4$ ($\alpha 2$ - $\beta 4$) (Lee et al., 1995), l'hélice $\alpha 3$ et le brin $\beta 5$ ($\alpha 3$ - $\beta 5$) (Grishina and Berlot, 2000), ainsi que l'hélice $\alpha 4$ et le brin $\beta 6$ ($\alpha 4$ - $\beta 6$) (Onrust et al., 1997) sont impliqués dans le couplage ou la sélectivité du couplage au récepteur. Cependant, parmi ces régions de la sous-unité $G\alpha$, seules les queues N- et C-terminales ainsi que l'hélice $\alpha 4$ interagissent directement avec le récepteur dans la structure cristalline du complexe $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$ lié au $\beta 2AR$ (Rasmussen et al., 2011b) suggérant qu'il existe plusieurs façons d'engager le complexe hétérotrimérique aux récepteurs et que ces modes de couplage pourraient être spécifiques à chaque famille de protéines G hétérotrimériques et aux récepteurs. En fait, le couplage est aussi sensible à la conformation induite sur les récepteurs puisque pour certains RCPGs qui peuvent recruter plus d'un type de complexe hétérotrimérique, les sous-unités engagées sont fonction du ligand utilisé. Par exemple, le ligand WIN55,212-2 est un agoniste du récepteur au canabinoïdes de type 1 (CB1) pour l'engagement des sous-unités $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ et $G\alpha_{i3}$. Inversement, le ligand du CB1 SR141716 agit comme inverse agoniste sur ces mêmes effecteurs. Cependant, le ligand du CB1 desacetyllevonantradol est un agoniste pour $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_{i2}$ mais un inverse agoniste pour $G\alpha_{i3}$. Au contraire, le ligand du CB1 (R)-méthanandamide est un inverse agoniste pour $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_{i2}$ mais un agoniste pour $G\alpha_{i3}$ (Mukhopadhyay and Howlett, 2005). D'une manière similaire, l'activation par un peptide du récepteur activé par les protéases de type 1 (PAR1) favorise l'activation de G_q par rapport à $G_{12/13}$ comparé à l'activation de PAR1 par la thrombine. Cette différence explique les propriétés physiologiques de ces ligands car l'activation de $G_{12/13}$ par

PAR1 et non G_q contrôle la perméabilité des cellules endothéliales (McLaughlin et al., 2005). Ainsi, la structure cristalline du β_2AR avec le complexe $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$ n'est probablement qu'une solution d'un ensemble de mode de couplage possible. Cependant, il est à noter que cette structure explique certains éléments importants du couplage de G_s au β_2AR . Par exemple, l'interaction des queues n- et C-terminales de la sous-unité $G\alpha_s$ avec la BI2 du récepteur dans la structure cristalline est en accord avec le rôle de cette région du β_2AR dans le contrôle de l'activation de la signalisation de la sous-unité G_s (Valiquette et al., 1995).

Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ ont aussi un rôle dans le couplage du complexe hétérotrimérique au récepteur. Bien que toutes les combinaisons de sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ soient possibles, certains complexes $G\beta\gamma$ peuvent se coupler de manière préférentielle avec certains récepteurs. Par exemple, en présence des sous-unités $G\alpha_s$ et de $G\gamma_2$, du β_1AR et du récepteur à l'adénosine de type A_2 (A_2AR) engagent de manière préférentielle la sous-unité $G\beta_4$ (McIntire et al., 2001). De plus, la sous-unité $G\gamma$ influence aussi la sélectivité du couplage des protéines G. Par exemple, le récepteur muscarinique de type 2 (M_2) engage les complexes $G\alpha_0\beta_1\gamma_5$ et $G\alpha_0\beta_1\gamma_7$ mais pas le complexe $G\alpha_0\beta_1\gamma_2$ (Hou et al., 2000). Étrangement, bien que l'interaction directe entre les sous-unités du complexe $G\beta\gamma$ et les récepteurs a été démontrée dans plusieurs études, aucun contact entre le β_2AR et le complexe $\beta_1\gamma_2$ n'est observé dans la structure cristalline (Taylor et al., 1994; Kisselev and Downs, 2006; Rasmussen et al., 2011b).

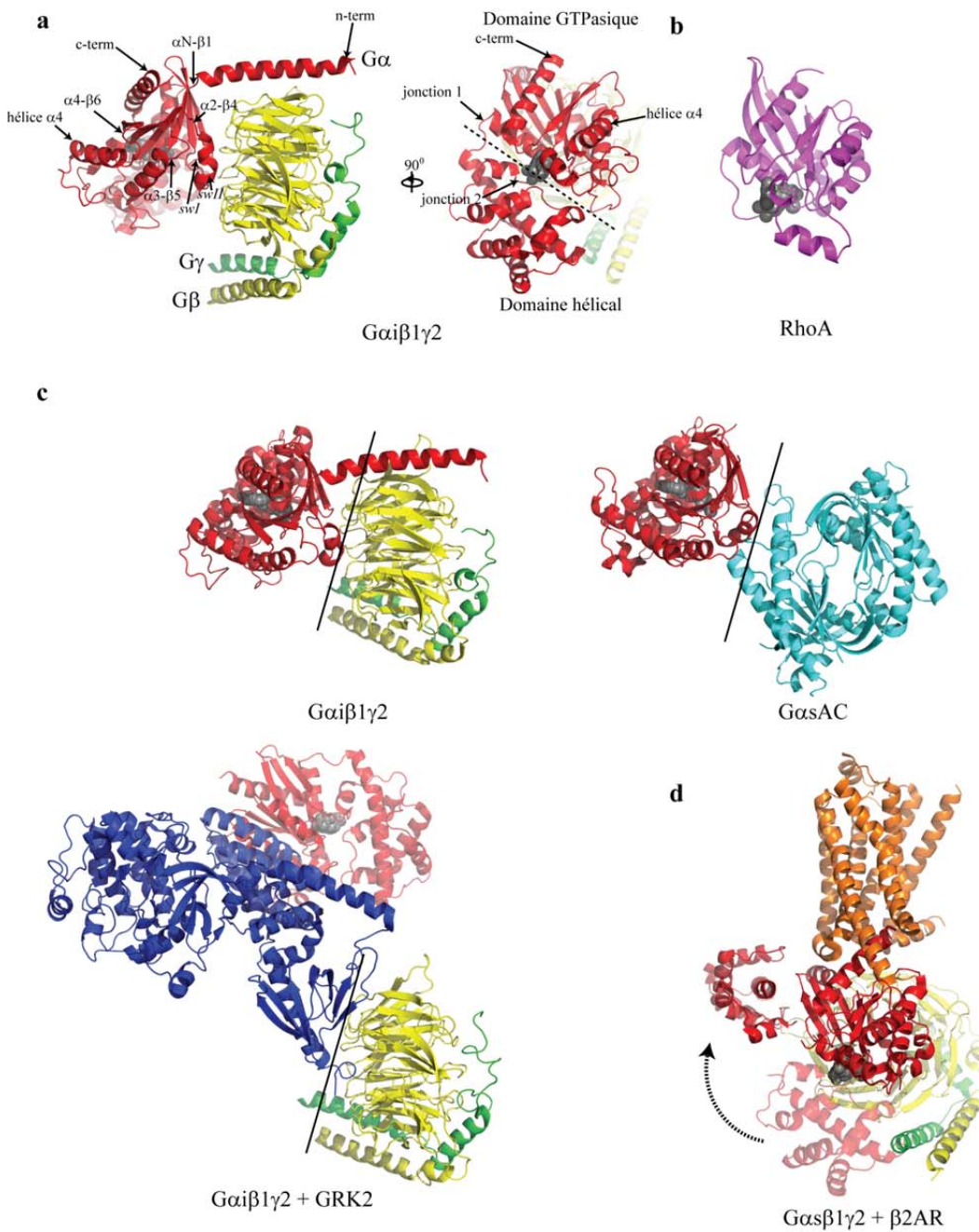


Figure 11. Propriétés structurales des protéines G hétérotrimériques. a) Structure cristalline des protéines G hétérotrimériques G $\beta_1\gamma_2$ liée au GDP (pdbid 1gg2). b) La structure du domaine GTPasique de la sous-unité G α est très homologue à la structure cristalline de la petite protéine G monomérique RhoA (pdbid 1a2b). c) Comparaison des structures cristallines du complexe G $\beta_1\gamma_2$ lié au GDP (pdbid 1gg2), du complexe entre l'AC et G s (pdbid: 1cul) lié

au GTP, ainsi que du complexe entre GRK2, G_q lié au GDP et $G\beta_1\gamma_2$ (pdbid: 2bcj). Ces effecteurs partagent les mêmes surfaces d'interaction (lignes pleines) sur $G\alpha$ et $G\beta$ que dans le complexe hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$. d) Structure cristalline du complexe entre le $\beta 2AR$ et $G_s\beta_1\gamma_2$ sans nucléotide (pdbid: 3sn6). Le mouvement de rotation de 130° du domaine hélical entre les états lié au nucléotide (transparent) et celui sans nucléotide est indiqué par la flèche pointillée. Les nucléotides sont représentés par des sphères grises. Les sous-unités $G\alpha$ sont rouges, les $G\beta$ sont jaunes, les $G\gamma$ sont verts, les sous-unités catalytiques de l'AC sont bleues pâles, la GRK2 est bleue foncé et le $\beta 2AR$ est orange. Les domaines importants sont indiqués par des flèches noires. "swI" et "swII" sont les abréviations de "switch I" et "switch II" respectivement. "c-term" et "n-term" sont les abréviations de "queue C-terminale" et "queue N-terminale" respectivement.

Protéines kinases des RCPGs (GRK)

Les GRKs sont membres d'une famille de protéines kinases qui phosphorylent notamment certains résidus sérines / thréonines présents sur la troisième boucle intracellulaire et la queue C-terminale des RCPGs activés mais aussi sur d'autres cibles intracellulaires (Gurevich et al., 2012). Elle comprend sept membres classés en trois sous-familles selon l'homologie de leur séquence protéique: la sous-famille GRK1 incluant les GRK1 et GRK7, la sous-famille GRK2 incluant GRK2 et GRK3 ainsi que la sous-famille GRK4 comprenant GRK4, GRK5 et GRK6. Alors que GRK1 et GRK7 sont exprimées majoritairement dans le système visuel et que GRK4 est exprimée notamment dans le cervelet, GRK2, 3, 5 ainsi que GRK6 sont exprimées de manière ubiquitaire (Sallese et al., 2000b; Gurevich et al., 2012; Ferguson, 2001). Les GRKs sont constituées de trois domaines: un domaine N-terminal homologue à celui régulant la signalisation des protéines G (homologue aux domaines RGS ou RH), un domaine central catalytique et un domaine C-terminal (Ferguson, 2001). Alors que les domaines RH et kinase sont impliqués notamment dans la désensibilisation de la signalisation et l'endocytose des RCPG (Perroy et al., 2003; Tesmer et al., 2005; Lohse et al., 1989; Gurevich et al., 2012; Sallese et al., 2000a; Breton et al., 2010), le domaine C-terminal permet la localisation des GRKs à la membrane plasmique par différents mécanismes. D'abord, le

domaine C-terminal de GRK2 et 3 contient un domaine homologue à la pleckstrine (PH) qui se lie à la sous-unité G $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques et le PIP2 (Pitcher et al., 1995). Ainsi, leur localisation à la membranaire dépend de celle de la sous-unité G $\beta\gamma$ et de l'accessibilité de la surface d'interaction qui est libérée lors de l'ouverture entre G α et G $\beta\gamma$, suite à l'activation par le récepteur. Toutes les autres GRKs sont constitutivement ancrées à la membrane plasmique par un motif de farnesylation (GRK1 et GRK7) (Inglese et al., 1992), de palmitoylation (GRK4 et GRK6) (Premont et al., 1996; Stoffel et al., 1994) ou un motif polybasique de 46 résidus (GRK5) (Premont et al., 1994). De plus, les membres de la famille des GRK4 (4-5-6) sont présents dans le noyau cellulaire et cette localisation pourrait jouer un rôle physiologique important (Johnson et al., 2004). Par exemple, GRK5 joue un rôle important dans l'hypertrophie cardiaque en phosphorylant la déacétylase des histones de type 5 (HDAC5) (Martini et al., 2008). L'activité des GRKs est régulée par plusieurs effecteurs cellulaires. Notamment, la PKA empêche la phosphorylation des récepteurs par GRK2 en phosphorylant la S685, ce qui diminue la liaison de GRK2 avec G $\beta\gamma$ tandis que la kinase régulée par des signaux extracellulaires de type 1 et 2 (ERK1/2) fait le contraire en phosphorylant la S670 (Cong et al., 2001b; Elorza et al., 2000). D'autres effecteurs comme la PKC (Pronin and Benovic, 1997), c-Src (Sarnago et al., 1999), CDK2-Cyclin A (Penela et al., 2010), les calvéolines (Gildea et al., 2009), la calmoduline (Chuang et al., 1996), l'actine (Freeman et al., 1998) et mdm2 (Salcedo et al., 2006) lient et régulent certains membres de la famille des GRKs.

Les arrestines

Généralités et nomenclature

Les arrestines sont une famille de protéines régulatrices des RCPGs qui contient 4 membres, arrestines 1 à 4. Les arrestines 1 et 4 sont exprimées presque exclusivement dans le système visuel alors que les arrestine 2 et 3, aussi appelées β arr1 et 2, sont ubiquitaires. Les arrestines sont recrutées par les RCPGs activés (Krasel et al., 2005) dont le domaine intracellulaire est préalablement phosphorylé par les GRKs pour y subir une transition allostérique activatrice (Gurevich and Gurevich, 2004; Xiao et al., 2004; Nobles et al., 2007).

Dépourvues d'activité enzymatique, les arrestines agissent alors en protéines d'échafaudage et leurs fonctions dépendent des partenaires protéiques engagés dans le complexe (Xiao et al., 2007). Classiquement, les arrestines ont été identifiées comme un facteur essentiel à l'endocytose et à l'arrêt de la signalisation des RCPGs (désensibilisation) induite par les protéines G hétérotrimériques (Benovic et al., 1987; Wilden et al., 1986; Kohout et al., 2001; Lohse et al., 1990). Cependant, il est clair que les arrestines, plus particulièrement les β arrestines, ont aussi un rôle important dans la transmission de la signalisation, indépendamment des protéines G hétérotrimériques, tel que cela sera discuté plus bas.

Structure tridimensionnelle

Depuis la fin des années 90s, 16 structures cristallines de membres de la famille des arrestines ont été élucidées (tableau II, page 42 de la section introduction). Toutes les arrestines ont un repliement conservé en double sandwich β formant 2 lobes, le c-domaine et le n-domaine relié par un bras espaceur, ainsi qu'une hélice α amphipatique, et des extrémités n- et C-terminales non-structurées (figure 12, page 43 de la section introduction).

Reconnaissance moléculaire et activation

La phosphorylation des domaines intracellulaires des RCPGs par les GRKs augmente considérablement l'affinité des arrestines pour les récepteurs (Gurevich et al., 1995; Hanson and Gurevich, 2006; Zhuang et al., 2013; Zhuang et al., 2013). Les domaines des récepteurs impliqués dans la liaison des arrestines sont la BI2 (Lan et al., 2009), la BE3 (Gelber et al., 1999) et la queue C-terminale (Nobles et al., 2007). Ces domaines interagissent avec les surfaces concaves du n- et du c-domaine des arrestines riches en résidus basiques chargés positivement (figure 12a et b, page 43 de la section introduction) (Han et al., 2001; Hanson et al., 2006b).

Tableau II. Liste des structures tridimensionnelles des arrestines.

Noms	Numéro PDB	Année	Résolution (Å)	Espèce	commentaires	référence
Arrestine-1 (<i>S-antigen</i> , <i>S-arrestin</i> , <i>rod arrestin</i>)	1AYR	1998	3.3	Bovin		(Granzin et al., 1998)
	1CF1	1999	2.8	Bovin		(Hirsch et al., 1999)
	3UGU	2012	1.9	Bovin	pré-active	(Granzin et al., 2012)
	3UGX		2.7	Bovin		
	4J2Q	2013	3.0	Bovin	pré-active	(Kim et al., 2013)
Arrestine2 (β arr1)	1G4M	2001	1.9	Bovin		(Han et al., 2001)
	1G4R		2.2	Bovin		
	1JSY	2002	2.9		fonction d'échafaudage	(Milano et al., 2002)
	1ZSH	2006	2.9	Bovin	+ IP6	(Milano et al., 2006)
	2IV8	2006	2.8	human	res. 383-402 + AP2	(Schmid et al., 2006)
	3GC3	2009	2.2	Bovin	+ clathrine	(Kang et al., 2009)
	3GD1		3.5	Bovin		
	2WTR	2009	2.9	Bovin	dimère	non-publiée
Arrestine3 (β arr2)	4JQI	2013	2.6	Rat	+ c-term phosphorylé du V2R	(Shukla et al., 2013)
	3P2D	2011	3.00	Bovin		(Zhan et al., 2011)
	1SUJ	2005	2.4	A.tigrinum		(Sutton et al., 2005)
Arrestine-4 (<i>Cone arrestin</i> , <i>X-arrestin</i>)						

Tous les structures sont à l'état inactif sauf lorsqu'indiquées; A.tigrinum, *Ambystoma tigrinum*; res, résidus; AP2 = protéine adaptatrice de type 2; IP6, inositol-hexaphosphate; c-term, cterminus; V2R, récepteur à la vasopressine;

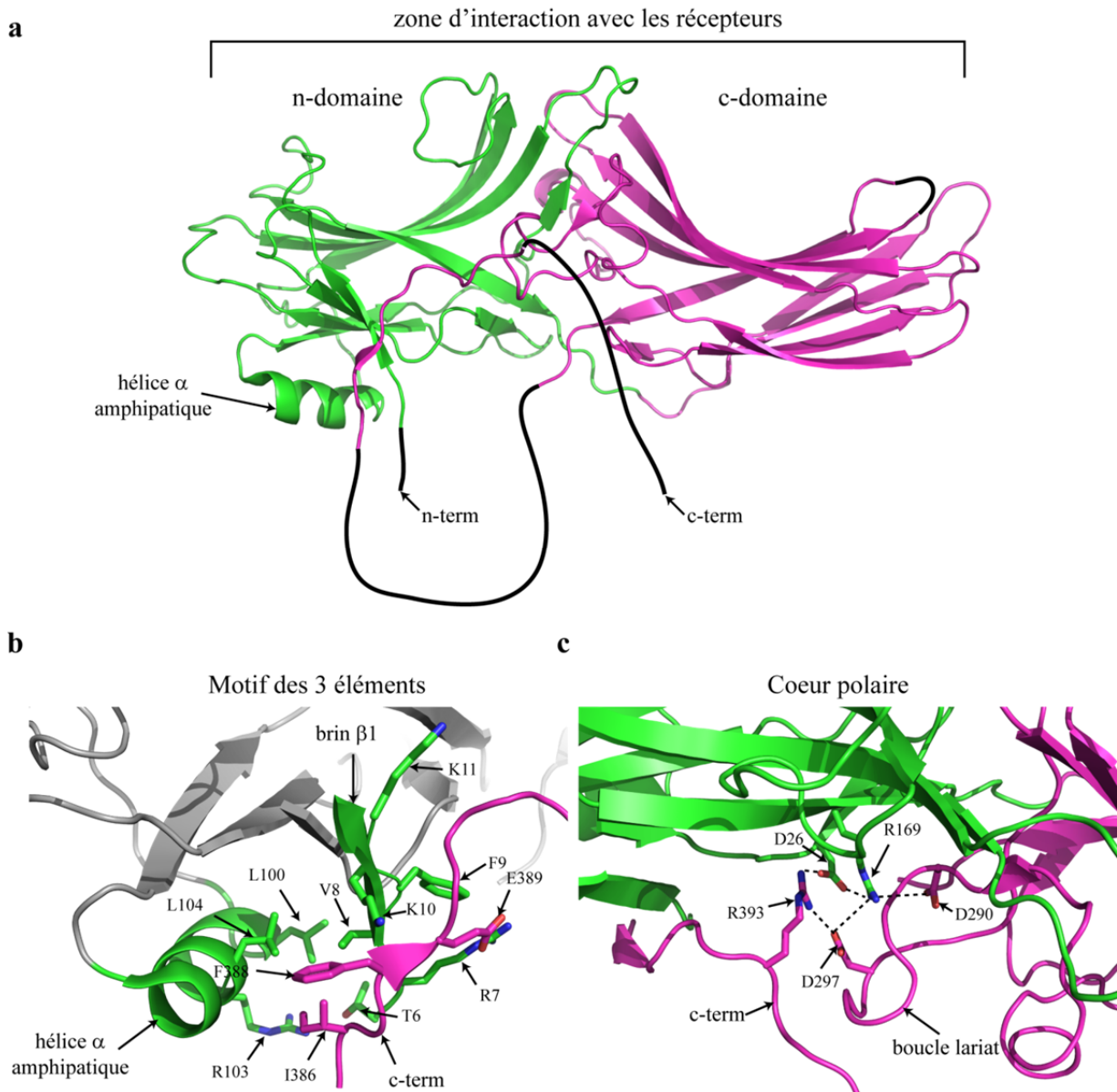


Figure 12. Structure cristalline de la β arr1 inactive. a) Représentation en ruban de la β arr1 (pdbid 1zsh). Les n- et c-domaines sont respectivement en vert et magenta. Les lignes noires courbes représentent les segments de la β arr1 non-résolus dans la structure, les flèches indiquent des résidus et structures importants et les lignes pointillées représentent des interactions électrostatiques. Deux motifs structuraux, b) le "motif des 3 éléments" constitué de l'hélice α amphipatique, le brin β 1 et la queue C-terminale, ainsi que c) le motif du cœur polaire, maintiennent l'arrestine dans un état inactif.

Deux motifs structuraux, le coeur polaire et le "motif des 3 éléments", stabilisent l'état inactif des arrestines et ancrent la queue C-terminale dans le n-domaine, cachant ainsi des sites d'interactions avec certains effecteurs présents proches de l'extrémité C-terminale (figure 12b et c, page 43 de la section introduction). Le coeur polaire est un réseau d'interactions ioniques entre les résidus D26 et R169 du n-domaine, D290 et D297 du c-domaine ainsi que R393 de la queue C-terminale (selon la séquence de la β arr1) (Hirsch et al., 1999; Vishnivetskiy et al., 1999) alors que le "motif des 3 éléments" est constituée d'interactions entre des résidus situés à l'extrémité N-terminale (brin β 1) pris en sandwich entre l'hélice α amphipatique et la queue C-terminale des arrestines (Vishnivetskiy et al., 2000) (figure 12b et c, page 43 de la section introduction). Certaines mutations perturbant ces éléments inhibent l'engagement des arrestines par les récepteurs phosphorylés alors que d'autres permettent aux arrestines d'être recrutées plus facilement par des récepteurs non-phosphorylés indiquant que ces motifs structuraux participent aux mécanismes d'activation des arrestines par les récepteurs (Vishnivetskiy et al., 2000; Kovoov et al., 1999; Celver et al., 2002; Gray-Keller et al., 1997; Hanson and Gurevich, 2006). L'activation des arrestines est initiée par la liaison de la queue C-terminale phosphorylée d'un récepteur sur le n-domaine. En fait, il a été suggéré que les phosphates du récepteur perturbent les interactions stabilisatrices en interagissant avec les résidus du coeur polaire et du "motif des 3 éléments". Ils pourraient induire ainsi des transitions conformationnelles incluant une réorientation importante des n- et c-domaine à la manière d'une coquille d'huître qui se referme (*clamshell*) et la libération de la queue C-terminale permettant l'exposition des sites d'interactions avec certains effecteurs (Xiao et al., 2004; Nobles et al., 2007; Gurevich and Gurevich, 2004; Shukla et al., 2013; Hanson et al., 2006b; Palczewski et al., 1991; Vishnivetskiy et al., 1999; Goodman, Jr. et al., 1996). Certains détails importants de cette hypothèse sont précisés dans la publication récente de la structure cristalline de la β arr1 en complexe avec un peptide représentant les résidus 346 à 368 de la queue C-terminale phosphorylé du V2R (Shukla et al., 2013) (figure 13a et b, page 50 de la section introduction). Cette étude prend avantage de l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît et stabilise la liaison du peptide sur la β arr1 en conformation active. Ainsi, sans confirmer l'hypothèse du *clamshell*, cette structure de la β arr1 présente une torsion de 20° de l'orientation relative des n- et c-domaines par rapport à la structure inactive en accord avec les études montrant l'importance de la longueur du bras espaceur entre les deux domaines pour

l'engagement de l'arrestine au récepteur phosphorylé (Vishnivetskiy et al., 2002). Aussi, tel que prédit, le peptide phosphorylé du V2R se lie au n-domaine de la β arr1 par l'intermédiaire d'un réseau de résidus basiques (figure 13b, page 50 de la section introduction). Parmi les 8 phosphates présents sur la queue C-terminale du V2R, 6 (T347, S350, S357, T360, S363 et S364) participent à la liaison sur la β arr1 en interagissant avec 4 arginines (R25, R62, R65 et R165) et 7 lysines (K10, K11, K77, K107, K138, K160 et K294). La plupart de ces résidus bloquent le recrutement des arrestines aux récepteurs phosphorylés indiquant que le mode de liaison de la queue C-terminale du V2R dans le cristal est représentatif de la réalité biologique (Vishnivetskiy et al., 2000; Hanson and Gurevich, 2006). De plus, il est intéressant de constater que la queue C-terminale du V2R n'interagit pas directement avec les résidus du coeur polaire malgré la perte de la plupart des interactions sauf celle entre D26 et R169 suggérant que l'action du peptide sur ce motif est allostérique (figure 13b, page 50 de la section introduction). En plus du coeur polaire, la liaison du peptide affecte le "motif des 3 éléments" et les 3 boucles à l'interface des n- et c-domaines situées entre les résidus 64-74 (boucle *finger*), 129-139 (boucle centrale) et 280-310 (boucle lariat). D'abord, en interagissant avec les K10, K11 et K107 du "motif des 3 éléments", l'extrémité C-terminale phosphorylée du peptide déplace la queue C-terminale de la β arr1 du n-domaine et conséquemment, le résidu R393 de la queue C-terminale formant une partie du coeur polaire (figure 13c, page 50 de la section introduction). Cette observation est en accord avec une plus grande exposition du C-terminale des arrestines après leur activation et confirme les études montrant l'importance des résidus K10 et K11 dans le recrutement des arrestines par les récepteurs phosphorylés (Nobles et al., 2007; Xiao et al., 2004; Vishnivetskiy et al., 2000). Alors que la position des chaînes latérales des résidus basiques du "motif des 3 éléments" est similaire dans la structure active et inactive, certains résidus situés dans les boucles semblent attirés par les phosphates du peptide induisant des changements dans la conformation des boucles (figure 13b et c, page 50 de la section introduction). D'abord, le résidu K294 de la boucle lariat interagit avec le phosphate du résidu T360 de la queue C-terminale du V2R. La distorsion induite sur cette boucle éloigne les résidus D290 et D297 du coeur polaire. De manière similaire, l'interaction entre le résidu K138 avec le phosphate du résidu S350 du peptide et le résidu R65 avec le phosphate du résidu S347 du peptide change la conformation des boucles centrale et *finger* respectivement en accord avec leur rôle dans la spécificité de couplage des arrestines avec les

récepteurs phosphorylés (Vishnivetskiy et al., 2013; Vishnivetskiy et al., 2004; Vishnivetskiy et al., 2011). La boucle *finger* pointe maintenant verticalement vers le récepteur et la chaîne latérale du peptide empêche la fermeture de la boucle sur le n-domaine (figure 13b, page 50 de la section introduction). Il a été suggéré que cette boucle s'insère à l'intérieur de la même cavité dans le récepteur que la queue C-terminale de la sous-unité $G\alpha$ de la protéine G hétérotrimérique G_s (Hanson et al., 2006b; Rasmussen et al., 2011b). Cette hypothèse est supportée par plusieurs études. D'abord, la boucle *finger* est dynamique mais devient fortement immobile en présence de récepteur phosphorylé (Hanson et al., 2006b), en accord avec l'immobilisation de la boucle dans une cavité intracellulaire du récepteur. Ensuite, tout comme la sous-unité $G\alpha$ des protéines G hétérotrimériques (De et al., 1980), l'engagement des β arrs aux récepteurs induit un effet allostérique qui augmente l'affinité des agonistes, du moins pour les récepteurs $\beta 2AR$, $M2$ (Gurevich et al., 1997), du peptide N-formyl (FPR) (Key et al., 2001) et neurokinine de type 1 (NK1) (Martini et al., 2002). Or, cet effet allostérique peut être induit par la liaison d'un anticorps au $\beta 2AR$ dans la même cavité que celle occupée par la queue C-terminale de la sous-unité $G\alpha$ de la protéine G hétérotrimérique G_s indiquant que cette cavité du récepteur est spécifiquement impliquée dans l'induction de l'effet allostérique (Rasmussen et al., 2011a). En accord avec cette hypothèse, l'ajout de l'anticorps stabilisant l'interaction entre la queue C-terminale d'un récepteur et la forme active de la $\beta arr1$, dans une préparation membranaire de récepteur en présence de $\beta arr1$, induit une forte augmentation de l'affinité de l'agoniste isoprotérénol (Shukla et al., 2013) indiquant que l'effet allostérique sur le récepteur provient de la conformation active de la $\beta arr1$. Cependant, l'immobilisation de la boucle *finger* dans les récepteurs et son implication dans l'induction d'un effet allostérique n'a jamais été montré directement et une structure cristalline montrant la liaison de la $\beta arr1$ avec un récepteur est requise pour conformer cette hypothèse. À cet effet, l'anticorps utilisé pour le co-cristal avec la queue C-terminale phosphorylée du $V2R$ et $\beta arr1$ sera sûrement très utile pour stabiliser le complexe récepteur / $\beta arr1$. À tout le moins, cet anticorps montre qu'en induisant un site de haute affinité pour les agonistes, les β arrs actives reconnaissent préférentiellement et stabilisent la forme active et phosphorylée des RCPGs. Ainsi, le n-domaine constitue un phosphosenseur important pour l'activation des arrestines par le domaine C-terminal phosphorylé des récepteurs. De manière intéressante, puisqu'il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique des β arrs, ce domaine constitue une cible de choix pour le

développement d'un petit composé organique inhibiteur qui interférerait avec la liaison de la queue C-terminale phosphorylée du V2R.

En plus des résidus liant la queue C-terminale du V2R dans la structure cristalline, d'autres dans le n- et du c-domaine sont impliqués dans l'association avec les récepteurs. Alors que la mutation en alanine de la majorité de ces résidus bloque la liaison des arrestines à tous les récepteurs, quelques-uns affectent la sélectivité de liaison des arrestines aux récepteurs, plus particulièrement ceux entre les régions 45-86 du n-domaine et 233-264 du c-domaine (Vishnivetskiy et al., 2011; Vishnivetskiy et al., 2004). Cependant, ces études se limitent souvent à comparer la rhodopsine avec d'autres récepteurs de la même famille afin de trouver les déterminants de l'engagement sélectif de l'arrestine-1 à la rhodopsine par rapport aux β arrs et les déterminants de sélectivité entre les β arrs ne sont pas connus. Or, bien que certains récepteurs engagent de manière non-préférentielle les 2 β arrs (ex: le V2R), d'autres sont sélectifs pour une β arr. Par exemple, le β 2AR engage préférentiellement la β arr2. Même si l'affinité est beaucoup moins importante, les arrestines peuvent aussi être engagées par des récepteurs non-phosphorylés et l'identité des résidus sur les arrestines responsable de la liaison diffère entre un récepteur actif phosphorylé, inactif-phosphorylé et actif non-phosphorylé, du moins pour la rhodopsine (Zhuang et al., 2013; Vishnivetskiy et al., 2004; Vishnivetskiy et al., 2011; Hanson and Gurevich, 2006). Ensemble, ces études montrent qu'il existe plusieurs modes de liaison des arrestines aux récepteurs.

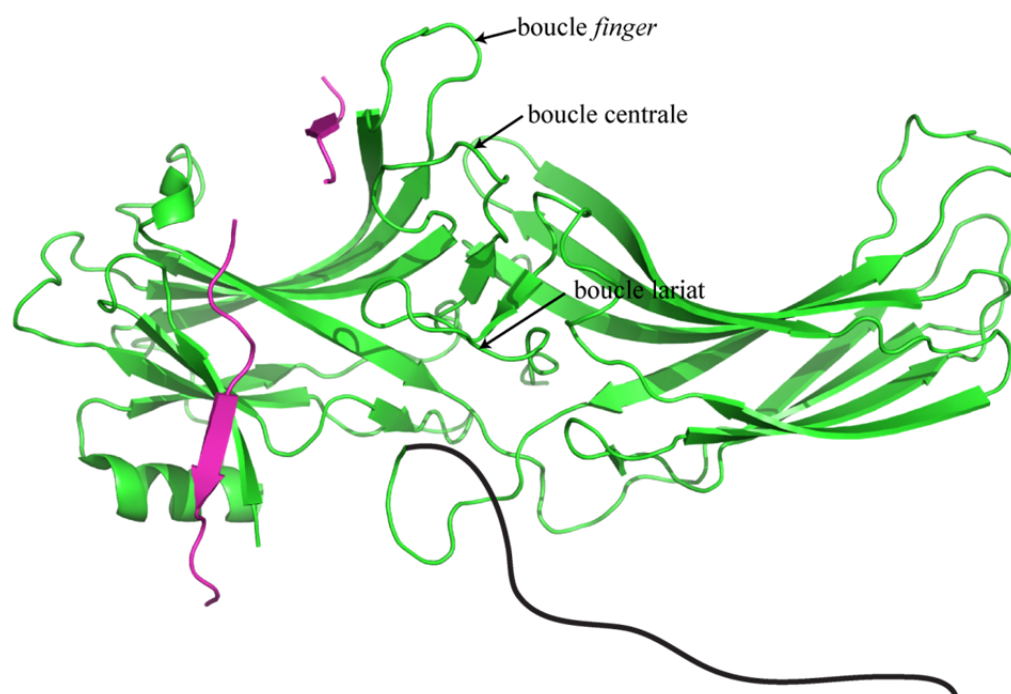
Il est intéressant de constater que la structure par résonance magnétique nucléaire (RMN) de la queue C-terminale phosphorylée de la rhodopsine liée à l'arrestine (pdbid: 1nzs) (Kisselev et al., 2004a; Kisselev et al., 2004b) diffère de celle de la queue C-terminale phosphorylée du V2R dans le co-cristal avec la β arr1 (figure 13a et b, page 50 de la section introduction). Dans le cas de la rhodopsine, les résidus basiques de l'arrestine-1 guident le repliement de la queue C-terminale phosphorylée en coordonnant les phosphates vers la surface d'interaction sur le n-domaine (Kisselev et al., 2004a). Puisque chaque RCPG possède un patron de phosphorylation unique, il est probable que leurs domaines intracellulaires possèdent leur propre repliement en présence des arrestines. Pour leur part, la conformation des arrestines est affectée par la liaison d'une petite molécule comme l'héparine (Xiao et al., 2004) ou à un effecteur comme les microtubules (Hanson et al., 2006a). De plus, pour un

même ligand, le changement conformationnel peut être différent entre les arrestines (Nobles et al., 2007). Lors de la stimulation d'un récepteur, les arrestines peuvent adopter plusieurs conformations selon l'identité du complexe ligand/récepteur et chaque conformation est associée à l'engagement d'effecteurs et à différentes réponses cellulaires (Shukla et al., 2008; Zimmerman et al., 2012; Coffa et al., 2011a). Ainsi la flexibilité conformationnelle des arrestines accommode probablement la multitude de repliements possibles de la queue C-terminales des récepteurs. En tant qu'effecteur des RCPGs, les arrestines agissent alors comme pivot signalétique en intégrant les signaux conformationnels des récepteurs.

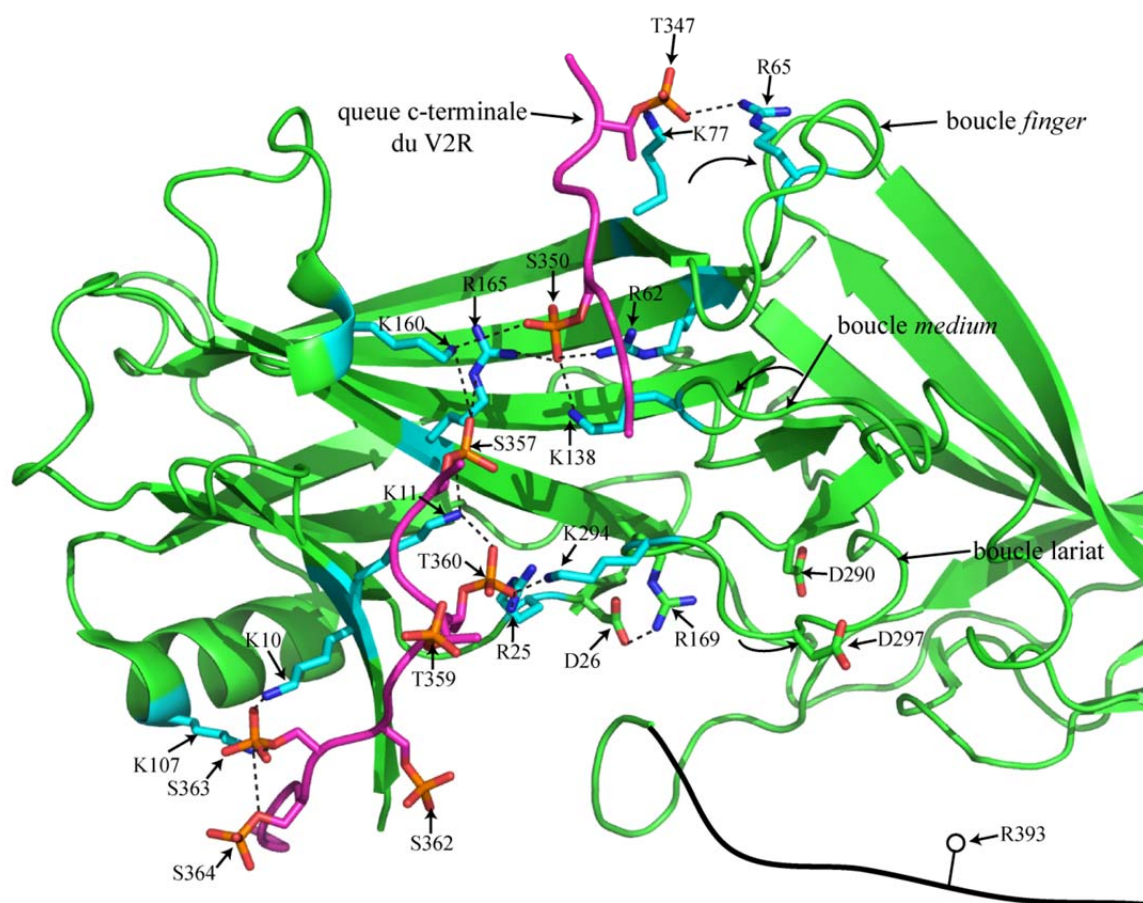
Hypothèse du code à barre de signalisation

Une des hypothèses qui explique le mécanisme moléculaire d'intégration des signaux des récepteurs par les β arrs a été énoncée par le groupe du Dr Robert Lefkowitz. Les récepteurs peuvent engager différentes GRKs qui phosphorylent alors de différentes manières les domaines intracellulaires des récepteurs (Busillo et al., 2010). L'hypothèse propose que les différents patrons de phosphorylation imposent différentes conformations sur les β arrs menant à différentes réponses signalétiques. L'identité des résidus phosphorylés du récepteur constituerait ainsi un signal analogue à celui d'un code à barre décrivant un produit dans un supermarché (Nobles et al., 2011). Cet énoncé est corroboré par plusieurs études montrant que la phosphorylation des récepteurs par différentes GRKs ou à différents sites mène à différentes réponses cellulaires et signalétiques (Busillo et al., 2010; Kara et al., 2006; Zidar et al., 2009; Krasel et al., 2008; Liu et al., 2008; Jones and Hinkle, 2008; Holmes et al., 2006). Par exemple, la phosphorylation du récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT1R) et du V2R par les GRK2-3 est importante pour l'endocytose et la désensibilisation et diminue la signalisation dépendante des β arrs. Au contraire, la phosphorylation de ces récepteurs par GRK5 et 6 entraîne la signalisation dépendante des β arrs sans influencer l'endocytose et la désensibilisation (Kim et al., 2005; Ren et al., 2005).

a



b



c

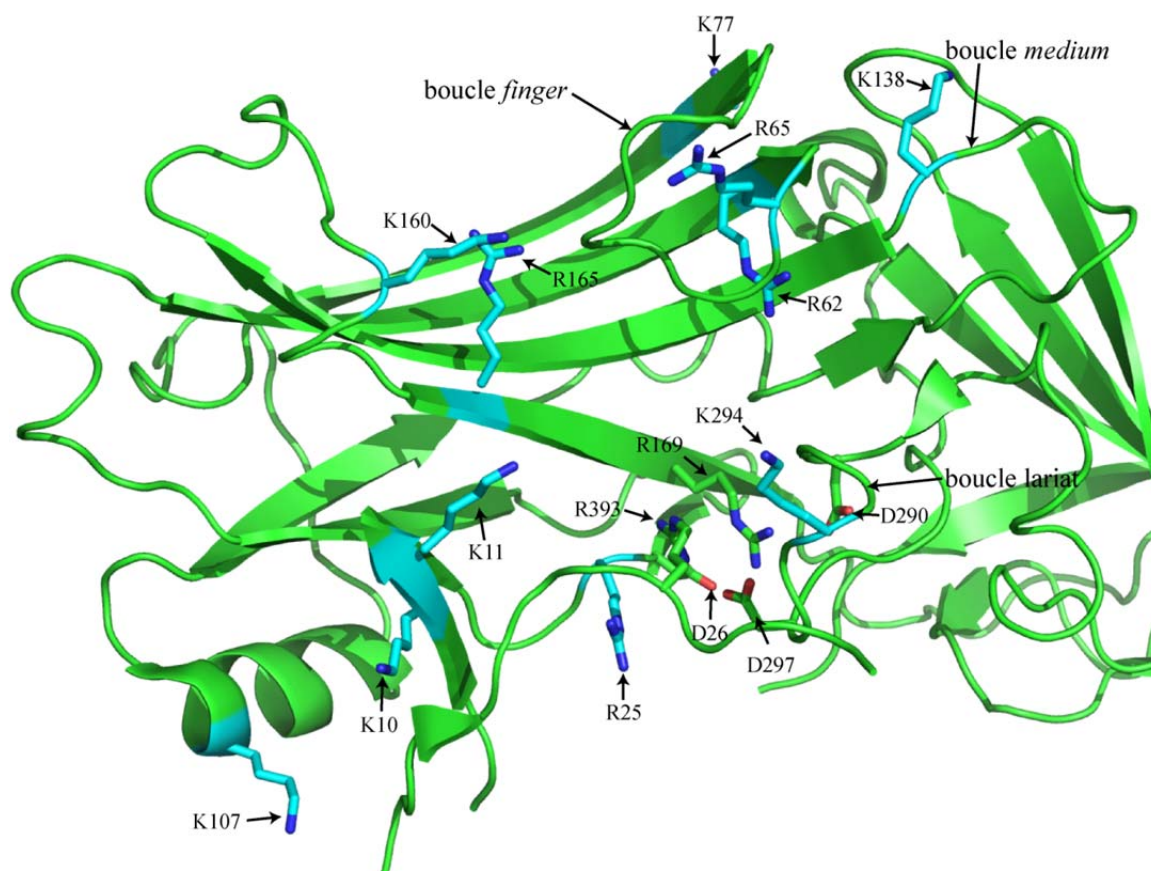


Figure 13. Activation de la β arr par les phosphates de la queue C-terminale des RCPGs.

Représentation a) en ruban ou b) en ruban et bâtonnet de la structure cristalline de la β arr1 active (vert) liée à l'extrémité C-terminale phosphorylée du V2R (magenta) (pdbid: 4jqi). c) N-domaine de la structure de la β arr1 inactive (pdbid: 1zsh) dans la même orientation que b). Les résidus liant les phosphates de la queue C-terminale du V2R sont représentés par des bâtonnets bleus. Les résidus du coeur polaire sont représentés par des bâtonnets verts. Certaines interactions électrostatiques sont indiquées par des lignes pointillées. Les résidus importants sont indiqués par des flèches droites. Le mouvement des boucles à l'interface entre le n- et c-domaine est indiqué par des flèches courbes. Les lignes noires représentent la conformation hypothétique de la queue C-terminale de la β arr1.

Rôles cellulaires et physiologiques de la signalisation des β arrs

Les β arrs sont des médiateurs importants de la signalisation des RCPGs qui n'est pas initiée par l'activation des protéines G hétérotrimériques. Pour ce faire, elles peuvent agir comme protéines d'échafaudage afin de former des complexes moléculaires avec plus d'une centaine d'effecteurs comme des kinases, des petites GTPases, des GEF, des ubiquitines ligases E3, des phosphodiesterases ainsi que des facteurs de transcription (Gesty-Palmer and Luttrell, 2008; Luttrell and Gesty-Palmer, 2010; Xiao et al., 2007) (tableau III, page 78 de la section introduction). Il est proposé que ces complexes signalétiques puissent être spécifiquement engagés au récepteur en reconnaissant la conformation du récepteur induite par la liaison d'un ligand. Cependant, l'activation des β arrs par un récepteur n'est pas toujours requise pour son rôle d'échafaudage car leur recrutement à la membrane plasmique, même en l'absence de stimulation activatrice d'un récepteur, engage aussi certains effecteurs et voie de signalisation (Terrillon and Bouvier, 2004). De plus, certains effecteurs sont engagés dans des complexes incluant la forme inactive des β arrs alors que d'autres se lient indépendamment de l'état d'activation (Xiao et al., 2007). L'association entre les effecteurs et les β arrs peut être directe ou indirecte. Parmi ceux liant directement les β arrs, les déterminants moléculaires de l'interaction ne sont connus que pour quelques effecteurs (figure 14, page 52 de la section introduction) et seulement 2 complexes ont été cristallisés à ce jour (Schmid et al., 2006). Cette section présente les effecteurs les plus connus associés à la signalisation médiée par les β arrs, ainsi que certains rôles cellulaires et pathophysiologiques qui sont associés.

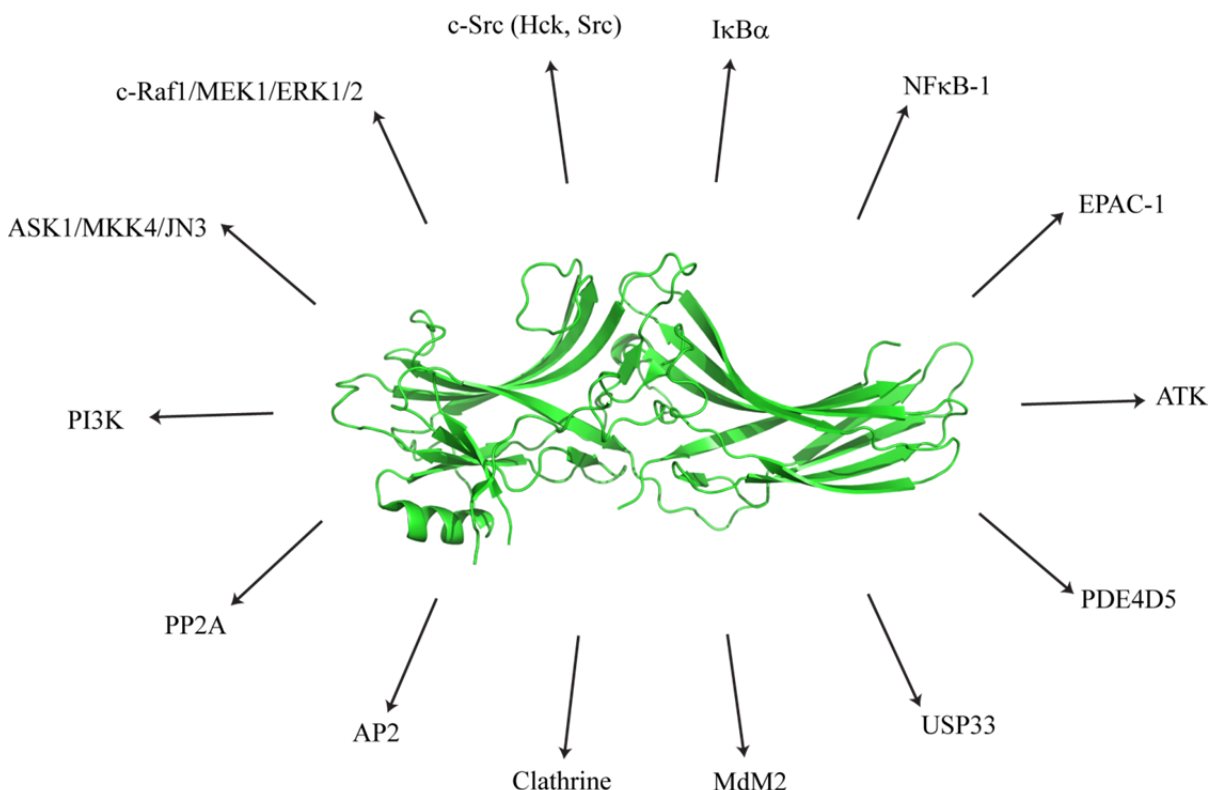


Figure 14. Exemple d'effecteurs formant un complexe direct avec les βarrs. Flèches indiquant les effecteurs qui interagissent directement avec au moins une des βarrs. Au centre, représentation en ruban de la structure cristalline de la βarr1 (pdbid: 1zsh). Figure adaptée de (Defea, 2011).

Le premier effecteur des βarrs identifié est la protéine kinase non-récepteur des tyrosines c-Src (Luttrell et al., 1999). Lors de l'activation du β2AR par un agoniste, la liaison de c-Src avec la βarr1 mène à l'activation des ERK1/2, membre de la famille des MAPK. D'autres études ont confirmé le rôle du complexe βarr1 / Src dans la signalisation des RCPG. Entre autre, l'engagement de c-Src par la βarr1 lors de l'activation du récepteur NK1 par la substance P active aussi ERK1/2 ce qui prévient l'apoptose et augmente la prolifération cellulaire (Defea et al., 2000a). L'interaction de c-Src avec la βarr1 se fait notamment par l'intermédiaire de la région catalytique de c-Src (Miller et al., 2000) mais aussi par son domaine d'interaction homologue aux Src de type 3 (SH3) (Luttrell et al., 1999). La βarr1 possède 3 motifs polyprolines pouvant potentiellement lier les domaines SH3, soit les motifs

P⁸⁸XXP⁹¹, P¹²¹XXP¹²⁴ et P¹⁷⁵XXP¹⁷⁸ (Milano et al., 2002)(figure 15, page 57 de la section introduction). La double mutation P91G / P121E sur la β arr1 réduit la liaison de c-Src à la β arr1 après stimulation du β 2AR par un agoniste (Luttrell et al., 1999) indiquant que minimalement, les 1^{er} et 2^e motifs sont importants pour la formation du complexe c-Src / β arr1. De manière intéressante, ces résidus sont situés sur une surface de la β arr1 qui contient le plus de variabilité de séquences entre β arr1 et β arr2 suggérant que cette zone pourrait coordonner la liaison spécifique d'effecteurs pour l'une ou l'autre des β arrs. En accord avec le rôle de ces résidus dans la sélectivité de liaison de c-Src, la β arr2 n'a pas le 2^e motif et ne lie pas c-Src. En plus de c-Src, la β arr1 s'associe avec d'autres kinases de la même famille comme la kinase des cellules hématopoïétiques (Hck) ou la kinase du sarcome félin de Gardner-Rasheed (c-Fgr) pour contrôler notamment l'acheminement vésiculaire à la membrane plasmique (Barlic et al., 2000). Par exemple, le complexe Hck / β arr1 est formé après l'endocytose du récepteur aux chimiokines de motif CXC de type 1 (CXCR1) et favorise la fusion des vésicules de sécrétion et la relâche de granules sécrétion des cellules neutrophiles du système immunitaire (Barlic et al., 2000). En outre, le double mutant P91G/P121E de la β arr1 empêche la sécrétion de granule par la stimulation de CXCR1 suggérant que Hck partage le même mode de liaison que Src sur la β arr1.

Les β arrs jouent un rôle important dans l'activation des MAPK par les RCPGs. Il existe 3 classes de MAPK dans les cellules de mammifères: ERK, les kinases de l'extrémité N-terminale de c-jun / les kinases activées par le stress (JNK / SAPK) et les kinases p38 / HOG1. Chaque MAPK est activée spécifiquement via la phosphorylation par une MAPK kinase (MAPKK), qui a été préalablement activée via la phosphorylation par une MAPKK kinase (MAPKKK) formant ainsi une cascade activatrice signalétique. Les MAPK phosphorylent des facteurs de transcription, des éléments du cytosquelette ainsi que des cibles cytoplasmiques affectant plusieurs phénomènes cellulaires. En général, les ERKs sont importantes pour la transition G0-G1 et le passage de la mitose tandis que les JNK et les p38 sont impliquées dans la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'apoptose ainsi que la réponse au stress hormonal et environnemental (Pearson et al., 2001). Les β arrs entraînent l'activation des MAPK en agissant comme une plateforme d'assemblage maintenant à proximité les différentes protéines kinases de la cascade activatrice signalétique. *In vitro*, les β arrs interagissent notamment avec

les cascades c-Raf1-MEK1-ERK1/2 et ASK1-MKK4-JNK3, respectivement des MAPKKK / MAPKK et MAPK (Song et al., 2009; Coffa et al., 2011a). Aussi, plusieurs études démontrent l'implication de certains domaines des β arrs dans la liaison de ces kinases (figure 15, page 57 de la section introduction)(Miller et al., 2001; Song et al., 2009; Song et al., 2007). Notamment, les résidus 3 à 24 des β arrs semblent coordonner la liaison de JNK3, plus particulièrement les résidus 5 et 21 à 24 (Li et al., 2009b). Une autre étude identifie la séquence RRS_{SLHL} située entre les résidus 196 à 201 sur le c-domaine de la β arr2 comme importante pour la liaison et l'activation de JNK3 (Miller et al., 2001). Cependant, le motif RRS n'est retrouvé que sur la β arr2 de rat suggérant que les espèces ne partagent pas tous les mêmes sites de liaison des MAPK. La séquence entre les résidus F388 et R395 du c-terminal ainsi que celle entre les résidus 6 et 35 du n-domaine des β arr1 et 2 sont importantes pour la liaison de ASK1 (Li et al., 2009b). Plus particulièrement, la double mutation en alanine des résidus D26 et D29 bloque la liaison de ASK1 mais aussi de MEK1 sur les β arrs suggérant que les différentes cascades signalétiques peuvent partager les mêmes sites de liaison (Li et al., 2009b; Meng et al., 2009). Cependant, l'architecture de l'échafaudage des MAPKs sur les β arrs semble être spécifique pour chaque cascade puisque les deux kinases ont un rôle différent dans leur cascade respective, ASK1 étant une MAPKKK et MEK1 une MAPKK. De manière intéressante, la région du C-terminale des β arrs liant ASK1 contient aussi la séquence de liaison de la protéine adaptatrice de type 2 (AP2), un effecteur impliqué dans l'endocytose des RCPGs, suggérant que l'activation des MAPK se fait séquentiellement par rapport à l'endocytose des récepteurs. En accord avec cette hypothèse, les mutants de β arr1 qui empêchent l'endocytose des récepteurs sont aussi des dominants négatifs de l'activation des ERK par les agonistes (Luttrell et al., 1999). La MAPKK, MKK4, interagit avec un peptide comprenant les résidus 61 à 85 de la β arr1 mais pas avec un peptide similaire comprenant la triple mutation en alanine des résidus E66, E67 et D69 suggérant que ce domaine participe à la liaison de MKK4 (Li et al., 2009b). De manière intéressante, cette région constitue la boucle *finger* des β arrs qui présumément interagit fortement avec les récepteurs suggérant que l'interaction entre les β arrs et MKK4 doit se faire après la séparation des β arrs des récepteurs. De manière similaire, un peptide représentant les résidus 270 à 295 de la β arr2 lient ERK1/2 mais pas le double mutant K285A / R286A ou le mutant K295A suggérant que ces résidus participent directement à la liaison. En accord avec cette hypothèse, ces mêmes mutations sur

la β arr2 entière empêchent la liaison de ERK1/2 mais pas de JNK3 suggérant aussi que les sites de liaisons des MAPK sur les β arrs ne sont pas conservés entre les cascades signalétiques (Xu et al., 2008). De manière intéressante, le mutant R307A de la β arr1 diminue l'interaction avec c-Raf1 mais préserve l'interaction avec MEK1 et ERK2 suggérant que le résidu R307 participe directement à la liaison de c-Raf1 (Coffa et al., 2011b). Cependant, la mutation du résidu homologue sur la β arr2 n'a aucun effet indiquant que les sites de liaison des MAPKKK peuvent être différents entre les β arrs. Ensemble, ces études suggèrent que les sites d'interactions des protéines kinases pour chaque cascade d'activation, prise séparément, sont assez proches pour expliquer l'activation séquentielle des MAPKs (MAPKKK active MAPKK qui active MAPK) indiquant qu'elles décrivent de manière cohérente l'échafaudage des protéines kinases de la cascade des MAPK (figure 15, page 57 de la section introduction). Malgré tout, certains aspects du rôle des β arrs dans l'échafaudage et l'activation des cascades signalétiques de type MAPK demeurent mal compris. Par exemple, la liaison des MAPK aux β arrs n'est pas toujours suffisante pour leur activation. En effet, même si β arr1 et 2 s'associent à JNK3, seul la β arr2 peut augmenter son activité *in vitro* (Song et al., 2009). La résolution de la structure cristalline du complexe β arrs / MAPK permettrait de mieux interpréter les résultats de mutagenèse et comprendre précisément le rôle des β arrs dans l'activation des MAPKs.

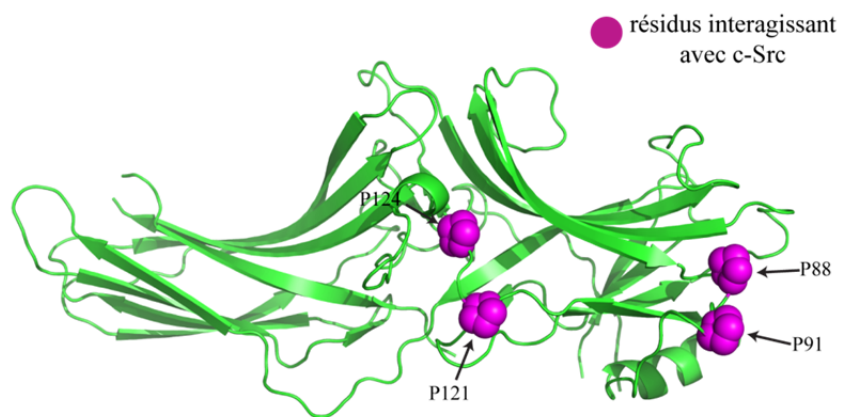
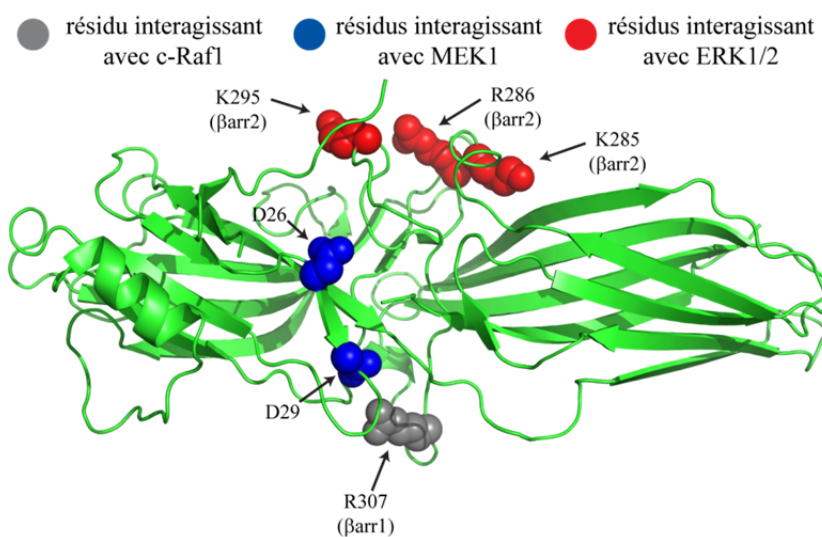
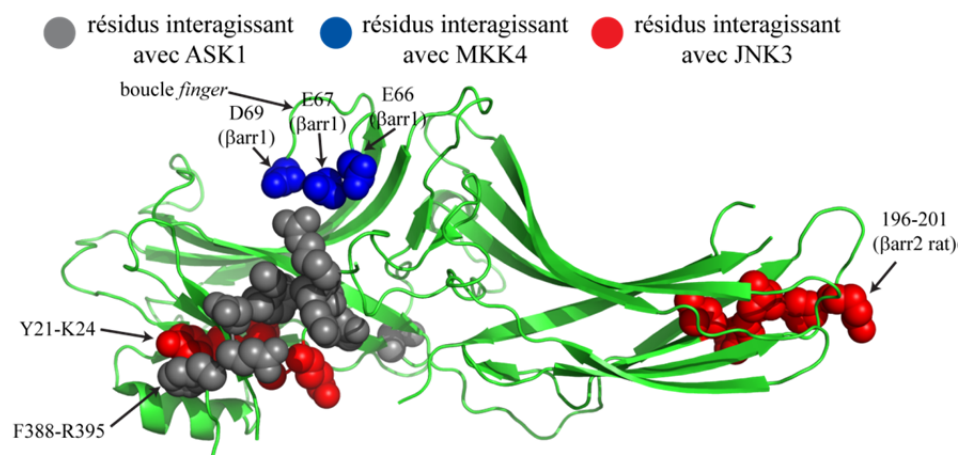
a**b****c**

Figure 15. Échafaudage de protéines kinases par les β arrs. Les résidus importants des sites d'interaction avec les protéines kinases a) c-Src et celles des cascades d'activation des MAPK b) c-Raf1/MEK1/ERK1/2 ainsi que c) ASK1/MKK4/JNK3 sont indiqués sur la structure de l'état inactif de la β arr1 (pdbid: 1zsh). a) Vue de côté avec le n-domaine à droite de l'image, b) vue du dessous avec le n-domaine à gauche de l'image, c) vue de côté avec le n-domaine à gauche de l'image. β arr1 ou β arr2 entre parenthèses indique que le site d'interaction n'a été démontré que pour β arr1 ou β arr2 respectivement. Les numéros de résidus correspondent à la séquence de la β arr1 sauf si β arr2 ou β arr2 rat est indiquée entre parenthèses. Dans ce cas, la séquence de β arr2 autre que rat ou β arr2 rat est indiquée.

Plusieurs récepteurs peuvent activer les MAPK en favorisant la formation de complexes avec les β arrs. La stimulation de l'AT1R par l'angiotensine induit la formation de complexes entre la β arr2 et les cascades signalétiques MAPK c-Raf1/MEK1/ERK1/2 (Luttrell et al., 2001) et ASK1/MKK4/JNK3 (McDonald et al., 2000). Entre autre, l'activation des ERKs par l'AT1R comporte une phase rapide maximale à 2 minutes dépendante de l'activité des protéines G hétérotrimériques et une phase lente maximale à 20 minutes dépendante du complexe β arr2/c-Raf1/MEK1/ERK1/2 (Ahn et al., 2004). Contrairement à la phase rapide, la signalisation des ERKs par l'AT1R dépendante de la β arr2 confine l'activité ERK dans le cytoplasme et n'entraîne pas la transcription de gènes comme ELK-1, normalement stimulé par ERK1/2 (Tohgo et al., 2002). Un des agonistes de l'AT1R, SII, active sélectivement la voie β arr2/ERK1/2, tout en activant que très faiblement la voie G_q . La stimulation de cardiomyocytes en culture avec SII provoque une augmentation de la force de contraction suggérant que cette voie, tout comme celle des protéines G hétérotrimériques, est impliquée dans les fonctions cardiaques (Wei et al., 2003; Rajagopal et al., 2006). Le traitement du récepteur β 2AR par l'ICI118551, un β -bloqueur sélectif et inverse agoniste de la voie de G_s , provoque l'activation des ERK1/2 par l'engagement des β arrs au récepteur et la formation du complexe β arrs/c-Raf1, MEK1 et ERK1/2 (Coffa et al., 2011b; Azzi et al., 2003). De manière intéressante, lors de la stimulation du β 2AR par l'ICI118551, l'association de ERK1/2 avec les β arrs augmente alors que celle de Raf1 et MEK1 reste stable suggérant que l'augmentation de l'activité MAPK par l'ICI118551 dépend de l'association de ERK1/2 aux β arrs (Coffa et al.,

2011a). D'autres récepteurs comme celui activé par la protéolyse de type 2 (PAR2) et le NK1, activent les ERKs par la formation d'un complexe comprenant au moins β arr1 et ERK1/2 (Defea et al., 2000a; Defea et al., 2000b). Tout comme la stimulation de l'AT1R, l'activation et l'endocytose de PAR2 confine l'activité des ERKs au cytoplasme. De plus, la formation du complexe signalétique β arr1/ERK1/2 par PAR2 active la chimiotaxie cellulaire en induisant la réorganisation du cytosquelette d'actine menant à l'extension des pseudopods vers le gradient d'agonistes (Ge et al., 2003). Dans le cas de des récepteurs AT1R et CXCR4, l'activité de p38 et β arr2 mais pas ERK1/2 est importante pour l'induction de la chemotaxie par les ligands (Hunton et al., 2005; Sun et al., 2002). Cependant, la formation d'un complexe entre p38 et β arr2 n'a jamais été démontrée.

Les récepteurs à activité kinase sur les tyrosines (RTK) sont des activateurs classiques des MAPK. Les RCPGs peuvent activer les MAPK en transactivant plusieurs RTKs dont le récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) (Kruk et al., 2013), le récepteur au facteur de croissance à l'épiderme (EGFR) (Maudsley et al., 2000) ou bien le récepteur au facteur de croissance similaire à l'insuline (IGFR) (Oligny-Longpre et al., 2012) quelquefois en activant les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs) de la famille des ADAM qui libèrent alors les ligands des RTKs en clivant les pro-ligands membranaires (Prenzel et al., 1999). D'autres mécanismes de transactivation des RTK par les RCPGs ont été suggérés selon le système étudié. Dans plusieurs cas, les mécanismes proposés impliquent l'engagement des β arrs et l'activation de c-Src (Hirota et al., 2012; Kim et al., 2008; Maudsley et al., 2000; Noma et al., 2007; Buchanan et al., 2006). Dans le cas de la transactivation de l'IGFR par un agoniste du V2R, l'activation des ERKs requiert à la fois le clivage d'un pro-ligand et la présence des β arrs en aval de l'IGFR, mais pas l'association directe des β arrs au V2R (Oligny-Longpre et al., 2012; Charest et al., 2007).

Les β arrs sont aussi impliquées dans la régulation la voie de signalisation de la protéine kinase AKT dans certains systèmes cellulaires et physiologiques. Par exemple, la β arr2 régule les signaux anti-apoptotiques induits par la phosphorylation de la protéine promotrice de la mort cellulaire associée à Bcl-2 (BAD) par AKT dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Ahn et al., 2009). Aussi, l'échafaudage de c-Src et AKT par β arr2 est importante pour la signalisation du récepteur à l'insuline chez la souris et la diminution de l'expression de

β arr2 dans le diabète de type 2 contribue à la résistance à l'insuline des tissus (Luan et al., 2009). De plus, la signalisation du D2R dans le corpus striatum est induite par les protéines $G_{i/o}$ (Enjalbert and Bockaert, 1983), mais aussi par la formation d'un complexe β arr2 / AKT / protéine phosphatase de type 2A (PP2A) menant à la déphosphorylation/inactivation d'AKT et conséquemment, à l'activation de kinase de la glycogène synthetase de type 3 β (GSK3 β). La formation de ce complexe initie les comportements dépendants de la dopamine chez la souris (Beaulieu et al., 2005). Le lithium, utilisé dans le traitement des maladies mentales comme le désordre bipolaire, la schizophrénie et la dépression, inhibe la formation de ce complexe *in vivo*. De plus, l'effet du lithium sur le comportement est inhibé dans les souris *knock-out* pour β arr2 (Beaulieu et al., 2008) en accord avec l'importance de ce complexe pour le phénotype du récepteur D2R.

D'autres études utilisant les souris KO pour les β arrs ont identifié certains rôles physiologiques pour ces dernières. Par exemple, l'activation du récepteur à la sérotonine de type 2A (5-HT2A) par la sérotonine induit des hallucinations associées aux désordres psychiatriques comme la schizophrénie ainsi que des effets secondaires dont les tics de la tête (Gonzalez-Maeso et al., 2007). Aucun tic de la tête n'est observé après l'injection de sérotonine à des souris *knock-out* pour la β arr2 indiquant l'implication de la β arr2 dans ce phénomène (Schmid et al., 2008). De manière similaire, la forte analgésie provoquée par la stimulation du récepteur aux opiacés de type μ (μ OR) par la morphine est accompagnée d'effets secondaires comme la dépression respiratoire et la constipation, mais pas dans les souris *knock-out* de β arr2 (Raehal et al., 2005). Contrairement aux études décrites plus haut, dans ces deux derniers cas, les mécanismes signalétiques conséquents à l'implication des β arrs n'ont pas été identifiés.

La validation des mécanismes moléculaires impliqués dans les rôles physiologiques des effecteurs de la signalisation des RCPG, notamment les β arrs, est difficile. En effet, les fonctions des β arrs sont déterminées par leur association avec des effecteurs cellulaires et à l'exception des méthodes biochimiques lourdes qui dénaturent le caractère natif de l'échantillon, il n'existe que peu d'alternative pour mesurer une interaction protéines-protéines dans un animal. Ainsi, ces études pourraient grandement bénéficier du développement de

nouveaux outils de mesure d'interaction protéines-protéines directement dans un contexte natif.

En plus d'être des vecteurs importants de la signalisation des RCPG dans le cytoplasme, les β arr1 et β arr2 transitent au noyau grâce à une séquence de localisation nucléaire (NLS) située dans le n-domaine (Wang et al., 2003) où elles peuvent engager des complexes protéiques incluant des facteurs de transcriptions. La séquence précise du NLS reste à déterminer mais le résidu K157 en ferait partie, du moins pour β arr1 (Hoepfner et al., 2012). Contrairement à la β arr1, la présence au noyau de la β arr2 n'est que transitoire puisqu'elle est constitutivement retournée dans le cytoplasme par une séquence d'export nucléaire (NES) située entre les résidus 398 à 407 (VXXXXFXLXL) de la queue C-terminale (Wang et al., 2003; Scott et al., 2002). De plus, certains récepteurs peuvent réguler la transcription en modifiant la localisation cellulaire des β arrs. Par exemple, la stimulation du récepteur δ OR provoque un enrichissement de la β arr1 au noyau. La β arr1 va alors stimuler la transcription des gènes *c-FOS* et *p27* en se liant à leur promoteur et en recrutant l'histone acétyltransférase p300 provoquant l'acétylation de l'histone H4 et l'inhibition de la croissance de cellules neuronales (Kang et al., 2005). Aussi, la stimulation du récepteur odorant hOR17-4 impliqué dans la communication entre les spermatozoïdes et les ovules, provoque la translocation de la β arr2 au noyau des spermatozoïdes de manière dépendante à la phosphorylation du récepteur hOR17-4 par PKA. Dans le noyau, la β arr2 active la transcription et forme un complexe avec l'hélicase DHX8 dépendante de l'ATP, GAPDH-2, l'histone H2A, la protéine similaire à la kinésine KIF14 et RCC-1. Puisque toutes ces protéines se localisent dans des régions de la chromatide sensible aux nucléases, cette étude suggère que la β arr2 participe à l'initiation de la transcription dans le pronoyau mâle du zygote peu de temps après la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule (Neuhaus et al., 2006). En accord avec le rôle critique des β arrs dans les étapes précoces du développement embryonnaire, les doubles *knock-out* β arr1 et β arr2 ne sont pas viables chez la souris.

La translocation nucléaire des β arrs n'est pas toujours requise pour la régulation de la transcription. Par exemple, il a été décrit que la β arr module l'activité transcriptionnelle du facteur nucléaire potentialisateur de chaîne légère κ de cellules B activées (NF- κ B), une famille de facteurs de transcription activée notamment par le stress oxydatif, les cytokines ainsi

que les infections et qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation, la migration cellulaire, la régulation immunitaire et l'apoptose. À l'état basal, l'inhibiteur de NF- κ B de type α (I κ B α) interagit avec NF- κ B et masque son site de localisation nucléaire. NF- κ B est alors retenu dans le cytoplasme et ne peut pas activer la transcription. La phosphorylation d'I κ B α par un complexe de kinases provoque la dégradation de I κ B α , l'acheminement de NF- κ B au noyau et l'activation de la transcription. Ainsi, les β arrs servent de protéines d'échafaudage pour des facteurs impliqués dans la régulation positive ou négative de l'activité de NF- κ B. Par exemple, les β arrs régulent négativement l'activité de NF- κ B en interagissant avec I κ B α ce qui le protège de la phosphorylation par les kinases et empêche sa dégradation (Gao et al., 2004; Witherow et al., 2004). Des mutants de délétions montrent que les 60 premiers résidus du n-domaine des β arrs et les 47 derniers résidus d'I κ B α sont impliqués directement dans l'interaction. De plus, l'implication des β arrs dans la régulation de l'activité de NF- κ B pourrait être un mécanisme de régulation de l'inflammation par les RCPGs. Par exemple, la stimulation du β 2AR augmente l'association de la β arr2 avec I κ B α inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de NF- κ B en réponse au facteur de nécrose tumorale de type α (TNF α) (Gao et al., 2004). Au contraire, une étude récente suggère que la β arr2 est importante pour l'activation de NF- κ B par des récepteurs au LPA (acide lysophosphatidique) notamment en s'associant à CARMA3, un facteur impliqué dans l'activation de NF- κ B induite par les récepteurs au LPA (Sun and Lin, 2008). Ainsi, bien que la majorité des études identifient les β arrs comme inhibiteur de l'activité de NF- κ B, elles pourraient jouer un rôle activateur dans certains systèmes (Sun and Yang, 2010).

Il est clair qu'une meilleure compréhension des fonctions des RCPG et des β arrs dépend de la localisation subcellulaire des interactions avec leurs partenaires protéiques. De plus, le développement de nouveaux outils pour déterminer ces interactions dans un contexte natif pourrait aider à valider des événements *in vivo* de signalisation des RCPG impliquant notamment les β arrs.

Engagement des β arrestines avec des protéines membranaires non-RCPG

En plus d'agir comme effecteur des RCPGs, les β arrest se lient et régulent une multitude d'autres familles de récepteurs. Par exemple, la β arr2 est essentielle pour la signalisation des récepteurs Frizzles, des récepteurs à 7 domaines transmembranaires mais qui classiquement, n'engagent pas les protéines G hétérotrimériques. La stimulation du récepteur FZD par le ligand WNT entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice phosphorylée disheveled (DVL) menant à la stabilisation et à la translocation nucléaire du facteur β -caténine (Schulte et al., 2010). Les β arrest sont engagées par le complexe FZD/DVL et modulent la transcription induite par la signalisation (Chen et al., 2001), mais aussi l'endocytose de ces récepteurs (Chen et al., 2003b). Aussi, l'activation cellulaire par l'interféron- γ (IFN- γ) provoque la phosphorylation du transducteur du signal et activateur de transcription de type 1 (STAT1) qui transite alors au noyau pour activer la transcription de certains gènes. STAT1 est inactivé par déphosphorylation à l'aide de l'isoforme nucléaire de la tyrosine phosphatase des cellules T (TC45). β arr1 désactive STAT1 en recrutant STAT1 et TC45 dans le noyau accélérant ainsi la déphosphorylation de STAT1 (Mo et al., 2008). De plus, la β arr1 interagit directement avec le récepteur IGFR pour induire l'activation de la PI3K (Povsic et al., 2003) mais aussi pour favoriser son endocytose (Lin et al., 1998). Les β arrest se lient aussi aux lipoprotéines de faible densité (LDL) (Wu et al., 2003) et au complexe de récepteurs serine / thréonine kinase facteur de croissance transformant β -III / β -II (TGF β III/ β -II) (Chen et al., 2003a) pour favoriser leur endocytose et la régulation négative de leurs fonctions. De manière intéressante, la phosphorylation du domaine cytoplasmique de TGF β III par TGF β II dans le complexe entraîne l'engagement des β arrest et non la phosphorylation du récepteur par les GRK, indiquant l'existence de plusieurs mécanismes permettant le recrutement des β arrest.

D'autres protéines membranaires qui ne sont pas des récepteurs sont aussi régulées par les β arrest comme par exemple les échangeurs Na⁺/H⁺ (NHE) de type 1 et 5 (Simonin and Fuster, 2010; Szabo et al., 2005), les canaux calciques cardiaques de type (v)1.2 régulés par le voltage (Lipsky et al., 2008) et les canaux ioniques récepteurs transitoires du potentiel (TRP) (Shukla et al., 2010). De manière intéressante, la β arr2 est aussi engagée par la queue C-terminale de la néphrine, une protéine à 1 passage transmembranaire qui est un composant essentiel de la filtration glomérulaire du sang dans les reins. L'endocytose résultant de la

liaison de la β arr2 désensibilise la signalisation par la néphrine et donc potentiellement affecte la filtration par le diaphragme (Quack et al., 2006). Ainsi, l'abondance et la diversité des protéines régulées par les β arrs démontrent que leur rôle est plus vaste que celui, classique, de la régulation et la signalisation des RCPGs.

Régulation de la signalisation des RCPGs

Désensibilisation

La désensibilisation de la signalisation des RCPGs a été surtout étudiée dans le contexte de l'activation des voies qui dépendent de l'activation des protéines G hétérotrimériques. Cependant, elle constitue parfois un mécanisme pivot par laquelle le récepteur arrête de signaler par une protéine G hétérotrimérique et commence à signaler par un autre effecteur comme les β arrs. Plusieurs mécanismes provoquent la désensibilisation comme le découplage des protéines G hétérotrimériques, la séquestration des récepteurs de la surface cellulaire, la dégradation et l'arrêt de la synthèse des récepteurs ou des seconds messagers. La désensibilisation commence quelques instants après l'activation d'un récepteur alors que ses boucles cytoplasmiques et le domaine C-terminal sont phosphorylés par les protéines kinases dépendantes des seconds messagers (PKA, PKC) ainsi que par les GRKs. Les premières peuvent désensibiliser de manière hétérologue les récepteurs qui ne sont pas occupés par un ligand (Pitcher et al., 1992; Freedman and Lefkowitz, 1996; Bouvier et al., 1989). Parfois, la phosphorylation du récepteur par les protéines kinases dépendantes des seconds messagers change la sélectivité de couplage des protéines G alpha pour un récepteur, désensibilisant l'activité d'une protéine G et pour en sensibiliser une autre. Dans le cas des récepteurs β 1AR et β 2AR, la phosphorylation par PKA entraîne un transfert de couplage de Gs vers Gi (Martin et al., 2004; Daaka et al., 1997).

Contrairement aux protéines kinases dépendantes des seconds messagers, les GRKs phosphorylent et désensibilisent de manière homologue les récepteurs occupés par un ligand. Pour désensibiliser pleinement les récepteurs avec leur activité kinase, les GRKs requièrent la présence des β arrs (Pitcher et al., 1992). En fait, le rôle des GRKs dans le découplage des

protéines G semble être plutôt de créer une plateforme de liaison de haute affinité avec les β arrs. Par exemple, la phosphorylation du β 2AR par GRK2 augmente de 10 x l'affinité de la β arr pour le récepteur alors que la phosphorylation par PKA n'influence pas l'affinité (Lohse et al., 1992). Le recrutement des β arrs provoque la désensibilisation par le découplage stérique des effecteurs aux récepteurs (Magalhaes et al., 2012) mais aussi entraîne l'échafaudage au récepteur d'effecteurs enzymatiques qui dégradent les seconds messagers. Par exemple, les β arrs amènent la diacylglycerol kinase (DACK) au récepteur muscarinique de type 1 (M1) pour dégrader le DAG produit par l'activation du récepteur et inhiber la signalisation par PKC (Nelson et al., 2007). Aussi, la stimulation du β 2AR engage le complexe entre la β arrs et les phosphodiesterase PDE4D3 et PDE4D5 pour dégrader l'AMPc et diminuer l'activité PKA à proximité du récepteur (Perry et al., 2002). La désensibilisation peut survenir par la régulation directe des enzymes produisant les seconds messagers. Par exemple, le calcium intracellulaire et la phosphorylation par PKA inhibe l'activité des AC de type V et VI (Sunahara et al., 1996).

Désensibilisation indépendante de la phosphorylation

L'activité kinase des GRKs n'est pas toujours requise pour la désensibilisation des protéines G hétérotrimériques. Par exemple, la GRK2 utilise ses domaines RH et PH pour interagir respectivement avec les sous-unités $G\alpha_q$ et $G\beta\gamma$ stabilisant ainsi le complexe $G\alpha_q$ -GRK2- $G\beta\gamma$. La séparation des sous-unités $G\alpha_q$ et $G\beta\gamma$ par GRK2 ainsi que l'orientation de $G\alpha_q$ défavorable au couplage avec les récepteurs désensibilisent la signalisation des protéines G de ce complexe (Tesmer et al., 2005). Ce mécanisme de désensibilisation a été démontré pour le récepteur couplé aux protéines $G\alpha_q$ métabotrope au glutamate de type 1 (mGluR1) (Dhami et al., 2004). De plus, l'implication de GRK2 dans la désensibilisation de manière indépendante de son activité kinase a été montrée pour plusieurs récepteurs couplant à différentes protéines G hétérotrimériques comme le récepteur de l'hormone de stimulation foliculaire (FSHR) (G_s) (Reiter et al., 2001), le récepteur à la sérotonine de type 1b (5HT1b) (G_i) (Lembo et al., 1999), le récepteur (G_q et G_s) à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) (Dicker et al., 1999) et le récepteur α 2AR (G_i) (Breton et al., 2010). Cependant, le domaine RH de GRK2 n'interagit pas avec G_i et G_s indiquant que ce mécanisme de désensibilisation se

distingue de celle de G_q . Il existe donc plusieurs mécanismes de désensibilisation indépendants de l'activité kinase des GRKs (Sallese et al., 2000a). De manière intéressante, GRK4 désensibilise le récepteur au GABA de type b (GABAb) couplé à G_i (Perroy et al., 2003) de manière indépendante à son activité kinase indiquant que d'autres GRKs peuvent être impliquées dans ce phénomène.

En plus des protéines kinase ou les β arrs, d'autres effecteurs peuvent être engagés aux récepteurs pour désensibiliser la signalisation. Par exemple, la famille de protéines régulatrice de la signalisation des protéines G (RGS) inactive la signalisation des protéines G hétérotrimériques G_q et G_i/o en favorisant l'activité GTPase de la sous-unité $G\alpha$ (Sjogren and Neubig, 2010; Sethakorn et al., 2010). Certaines RGS sont recrutées directement aux récepteurs. Par exemple, RGS2 lie directement la 3^{ème} boucle intracellulaire du récepteur M1 (Bernstein et al., 2004) et du récepteur α -adrénergique de type 1A ($\alpha 1AAR$) (Hague et al., 2005) pour réduire la signalisation des sous-unités G_q . De plus, certains effecteurs comme la protéine d'échafaudage spinophiline interagissent directement la BI3 des récepteurs et engage des effecteurs comme les RGS pour atténuer la signalisation de certains récepteurs (Wang et al., 2005). D'autres, comme la phosducine dans le système visuel, lie et séquestre la unité $G\beta\gamma$ empêchant la réassociation de la sous-unité $G\alpha$ et réduisant aussi la signalisation des protéines G (Schulz, 2001). La calmoduline est un autre effecteur qui peut s'associer aux récepteurs et inhiber la signalisation, souvent de manière dépendant de la mobilisation du calcium intracellulaire par l'activation d'un récepteur (Ritter and Hall, 2009). Par exemple, la calmoduline lie la BI3 du μ OR et diminue l'activité basale du récepteur et l'activité induite par l'agoniste (Wang et al., 2000). Dans le cas du PTHR, la désensibilisation se déroule après l'internalisation du récepteur et est induite par l'association du récepteur avec le rétromère, un complexe protéique qui permet le transport rétrograde des protéines des endosomes vers l'appareil de golgi (Feinstein et al., 2011). Le V2R semble aussi utiliser ce mécanisme de désensibilisation (Feinstein et al., 2013).

Endocytose

La plupart des RCPG sont séquestrés de la membrane plasmique après stimulation par un agoniste à l'aide de puits membranaires tapissés de clathrine (Lefkowitz and Shenoy, 2005; Hamdan et al., 2007) (figure 16, page 70 de la section introduction). La formation de cage de clathrine conduit à l'apparition d'invaginations membranaires qui sont détachées de la membrane plasmique par l'action de la dynamine, une petite protéine G. Les β arrs ont un rôle central dans l'endocytose des récepteurs en servant de protéine d'échafaudage pour la machinerie d'endocytose. Pour ce faire, les β arrs interagissent directement avec AP2 et la clathrine pour former un complexe endocytique avec les récepteurs (Laporte et al., 1999; Laporte et al., 2000) (Goodman, Jr. et al., 1996)(figure 17, page 71 de la section introduction). Plus particulièrement, les résidus 373-377 (Krupnick et al., 1997) des β arrs et 334-341 de l'isoforme long de la β arr1 (Kang et al., 2009) sont responsable de l'interaction avec la clathrine alors que les résidus 385-395 de la queue C-terminale des β arrs ainsi que les résidus 53-57 de la queue N-terminale sont responsables de l'interaction avec la sous-unité β 2 et μ d'AP2 respectivement (Laporte et al., 2000; Schmid et al., 2006; Marion et al., 2007) (figure 17, page 71 de la section introduction). De manière intéressante, les résidus interagissant avec la sous-unité β 2 d'AP2 sont enfouis dans la forme inactive des β arrs (Milano et al., 2006). Aussi, l'activation des β arrs expose le site d'interaction et favorise l'interaction des β arrs avec AP2 (Shukla et al., 2013; Hamdan et al., 2007).

Certaines petites protéines G momériques qui contrôlent la formation, la fusion ainsi que le mouvement des vésicules entre les compartiments cellulaires interagissent avec les récepteurs ou leurs effecteurs pour réguler l'endocytose. Par exemple, le facteur de ribosylation de l'adénosine di-phosphate de type 6 (ARF6) est localisé exclusivement à la membrane plasmique et favorise l'endocytose de plusieurs RCPGs. La protéine d'activation de l'activité GTPase de ARF (GIT1), une GAP inactivatrice d'ARF6, est amenée à la membrane plasmique par GRK2 et réduit l'endocytose du β 2AR (Premont et al., 1998). Au contraire, le facteur d'échange des nucléotides de ARF (ARNO), une GEF activatrice de ARF6, forme un complexe avec les β arrs et ARF6 après stimulation du β 2AR pour augmenter son endocytose (Claing et al., 2001). De plus, Rab5 est important pour l'endocytose de certains RCPGs car il participe à la formation de vésicule à cage de clathrine et pour l'acheminement de ces

vésicules aux endosomes précoces (Zerial and McBride, 2001). Par exemple, Rab5 est activé par son interaction avec la queue C-terminale du récepteur AT1R activé et promouvoit l'internalisation du récepteur (Seachrist et al., 2002).

Quelques RCPGs internalisent de manière atypique. Par exemple, certains récepteurs comme le FPR (Vines et al., 2003), le récepteur au Glucagon (GR) (Krillov et al., 2008), le CXCR7 (Mahabaleshwar et al., 2012), le mGluR1 (Iacovelli et al., 2003), le récepteur de l'hormone de relâche de la gonadotrophine (Vrecl et al., 1998), le récepteur viral aux chemokines US28 (Fraile-Ramos et al., 2003), le récepteur à la somatostatine de type 2A (SST2A) (Brasselet et al., 2002), le récepteur PAR-1 (Paing et al., 2002) et le 5-HT_{2A} (Bhatnagar et al., 2001), internalisent de manière indépendante des β arrs. Aussi, les récepteurs peuvent être parallèlement ségrégés de la membrane plasmique par des vésicules tapissées de calvéolines. Par exemple, le récepteur β 1AR dont les sites de phosphorylation des GRKs sont déplétés n'interagit plus avec les β arrs et n'internalise plus par la voie des clathrines mais plutôt par celle des calvéolines (Rapacciuolo et al., 2003). D'autres récepteurs comme le récepteur à la dopamine de type 1 (D1R) (Kong et al., 2007), l'A1R (Gines et al., 2001) et le M1 (Shmuel et al., 2007) peuvent aussi internaliser par la voie des calvéolines.

Resensibilisation

Quelques RCPGs peuvent se recoupler à la signalisation des protéines G hétérotrimériques (resensibilisation) après la désensibilisation. Pour se faire, certains récepteurs comme le β 2AR internalisent et transitent dans des vésicules acides riches en protéines phosphatases où ils sont déphosphorylés, resensibilisés et réacheminés à la membrane plasmique (Krueger et al., 1997). Souvent, des protéines d'échafaudages comme les AKAP et les β arrs sont importantes pour l'engagement des protéines phosphatases aux récepteurs. Par exemple, les PP2A et PP2B s'associent avec AKAP250/Gravine, qui sont recrutées au β 2AR entraînant la déphosphorylation et la resensibilisation du récepteur (Shih et al., 1999; Lin et al., 2000). Aussi, la β arr1 forme un complexe avec PP2A qui est recruté au récepteur NK1 et qui resensibilise directement les récepteurs non internalisés à la membrane plasmique (Murphy et al., 2011). Ensembles, ces études suggèrent qu'il existe plusieurs mécanismes de resensibilisation de la signalisation des protéines G hétérotrimériques.

Adressage post-endocytaire des RCPGs

L'adressage des RCPGs après l'internalisation est important pour la régulation de l'activité signalétique. Généralement, les récepteurs internalisés dans les endosomes peuvent être recyclés à la membrane plasmique ou être dirigés vers les vésicules lysosomiales pour être dégradés. Au début des années 2000, il a été proposé que l'affinité d'un récepteur pour les β arrs est un déterminant important du contrôle de l'adressage post-endocytaire des RCPGs (Oakley et al., 2000). Un récepteur qui n'a pas une grande affinité ne va pas, ou très peu, internaliser avec les β arr dans les endosomes et va être resensibilisé rapidement et recyclé à la membrane plasmique. Au contraire, les récepteurs qui ont une forte affinité internaliseront avec les β arr dans les endosomes et seront éventuellement acheminés au lysosome pour être dégradés. Ces caractéristiques réfèrent aux récepteurs de classe A et B respectivement. La forte affinité des récepteurs de classe B pour les β arrs est déterminée par la présence d'un regroupement de résidus sérine / thréonine phosphorylés dans le domaine C-terminal des récepteurs (Oakley et al., 2001). Le profil d'adressage de plusieurs récepteurs a déjà été caractérisé. Par exemple, les récepteurs à la dopamine de type 1A (D1AR), α 1BAR, μ OR, β 2AR et à endothéline de type A sont des récepteurs de classe A alors que les récepteurs AT1R, à la neurotensine de type 1, V2R et de la relâche de la thyrotropine (TRHR) sont des récepteurs de classe B (Oakley et al., 2000). Généralement, les récepteurs de classe A lient favorablement la β arr2 et peu β arr1 alors que les récepteurs de classe B engagent fortement les β arr1 et 2 de manière non sélective. Cette classification est arbitraire et ne reflète pas l'adressage post-endocytaire de tous les récepteurs. Par exemple, la liaison de la β arr1 au PAR1 régule la désensibilisation mais pas l'internalisation ni la dégradation lysosomiale du récepteur (Paing et al., 2002). En fait, l'adressage du PAR1 au lysosome dépend de sa liaison avec la protéine d'adressage nexin-1 (SNX1) (Gullapalli et al., 2006; Wang et al., 2002). D'autres récepteurs comme le 5-HT2A (Bhatnagar et al., 2001) et le récepteur du facteur de relâche de la corticotropine de type 1 α (CRF1 α) (Holmes et al., 2006) vont co-internaliser avec les β arrs, mais ces dernières vont par la suite en partie être redistribuées dans des vésicules ne contenant pas de récepteurs. De plus, contrairement à l'idée que la β arr retient le récepteur dans la voie d'adressage au lysosome, plusieurs études suggèrent que les β arrs ont un rôle positif dans le recyclage des RCPGs. Par exemple, la GAP d'ARF contenant les domaines

ankyrines répétés et PH de type 2 (AGAP2) s'associe avec les β arrs et favorise le recyclage du β 2AR, un récepteur de classe A (Wu et al., 2013). Cependant, l'importance des β arrs dans l'endocytose des récepteurs rend difficile l'étude directe de cette hypothèse par des outils génétiques. Le développement d'un outil pharmacologique inhibant les fonctions des β arrs permettrait l'étude plus systématique de leur rôle dans le recyclage des RCPGs, particulièrement pour les récepteurs dont l'endocytose dépend des β arrs. Toutefois, le rôle positif des β arrs dans le recyclage a pu être confirmé pour certains récepteurs dont l'endocytose ne dépend pas des β arrs comme le FPR (Vines et al., 2003), le GR (Krillov et al., 2008) et CXCR7 (Mahabaleshwar et al., 2012). Ensemble, ces études indiquent que l'affinité des récepteurs pour les β arrs n'est pas le seul déterminant de l'adressage post-endocytyque des récepteurs. En fait, plusieurs protéines comme les petites protéines G monomériques de la famille des Rabs interagissent avec les RCPGs (Seachrist et al., 2002; Hamelin et al., 2005; Parent et al., 2009; Wikstrom et al., 2008; Esseltine et al., 2011) et régulent leur adressage. Par exemple, rab4 et rab11 sont impliqués respectivement dans le recyclage rapide et lent des récepteurs (Seachrist et al., 2000; van der Sluijs et al., 1992; Innamorati et al., 2001; Ren et al., 1998) alors que rab7 contrôle l'adressage des récepteurs entre les endosomes et les lysosomes (Meresse et al., 1995; Li et al., 2000). De plus, la liaison de NHERF-1 au motif PDZ du β 2AR favorise le recyclage du récepteur (Cao et al., 1999). Ces effets peuvent être inhibés par la phosphorylation de la S411 du β 2AR par GRK5. Une autre protéine, le facteur sensible au N-ethylmaleimide (NSF), lie les 3 derniers résidus de la queue C-terminale du β 2AR pour permettre le recyclage du récepteur (Cong et al., 2001a). Au contraire, la liaison de la protéine d'adressage associée aux RCPGs (GASP) à la queue C-terminale du récepteur δ -opioïde (δ OR) achemine le récepteur aux lysosomes pour être dégradé (Whistler et al., 2002). De manière intéressante, GASP interagit avec le domaine c-terminal de plus de 20 autres RCPG (Heydorn et al., 2004a). De plus, son rôle dans l'adressage de plusieurs de ces récepteurs comme le D2R (Bartlett et al., 2005) et le récepteur viral aux chemokines US28 (Tschische et al., 2010) a été confirmé, indiquant que GASP est largement utilisée pour le contrôle de l'adressage des récepteurs aux lysosomes. GASP étant exprimée seulement dans le système nerveux central, il pourrait contribuer à la spécificité tissulaire des patrons d'endocytoses des RCPGs (Simonin et al., 2004).

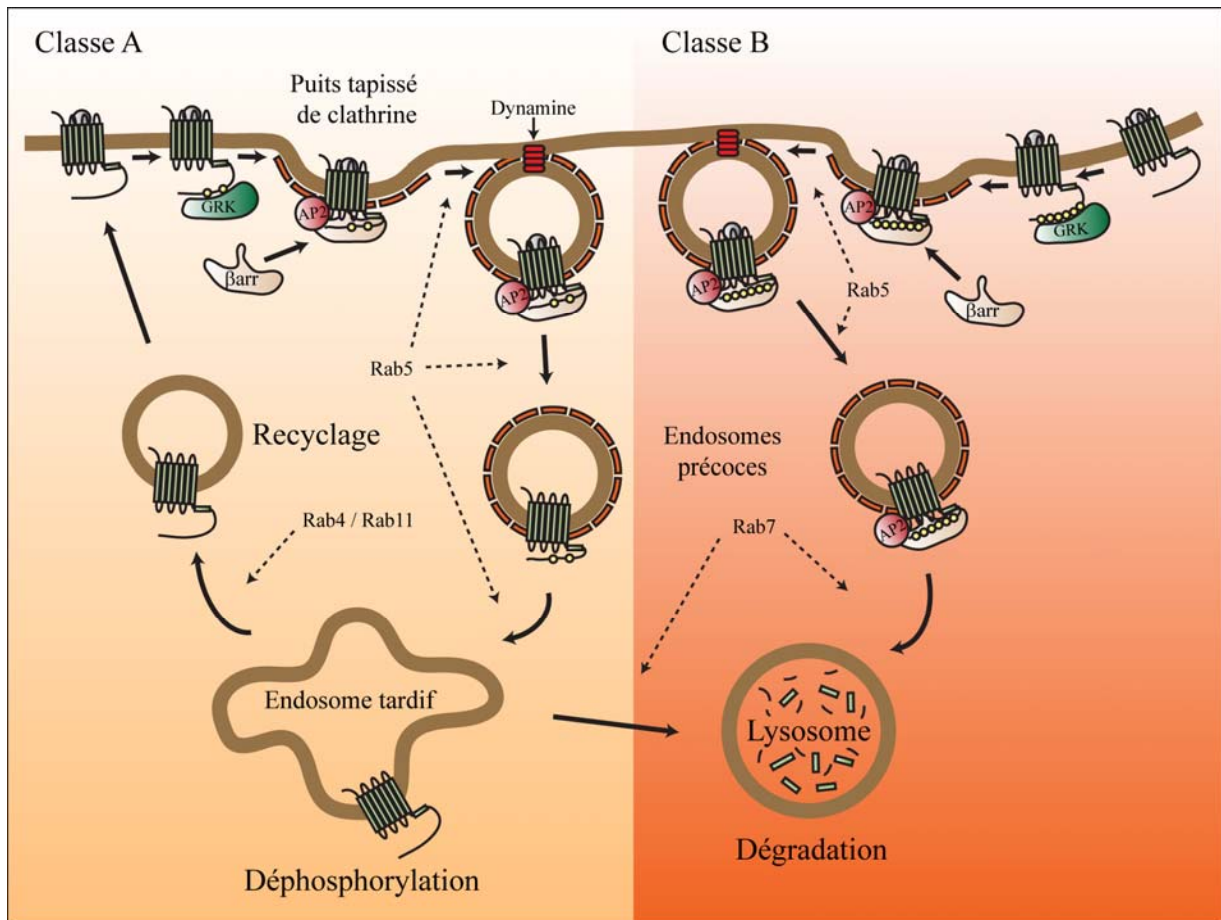


Figure 16. Endocytose, désensibilisation et adressage post-endocytique des RCPGs. Le domaine intracellulaire de la plupart des RCPGs activés est phosphorylé par les GRK, ce qui induit le recrutement des β arrs et le découplage des protéines G hétérotrimériques. Les β arrs servent aussi de protéines d'échafaudages pour la machinerie d'endocytose et favorise l'internalisation des récepteurs par des puits de clathrines. Les récepteurs qui ont une faible affinité pour les β arrs sont resensibilisés et recyclés à la membrane plasmique (récepteur de classe A) alors que ceux qui ont une forte affinité sont adressés aux lysosomes et dégradés (récepteur de classe B). Plusieurs autres effecteurs comme les protéines G monomériques de la famille des Rabs régulent ces processus. Les cercles jaunes sur les récepteurs sont des phosphates.

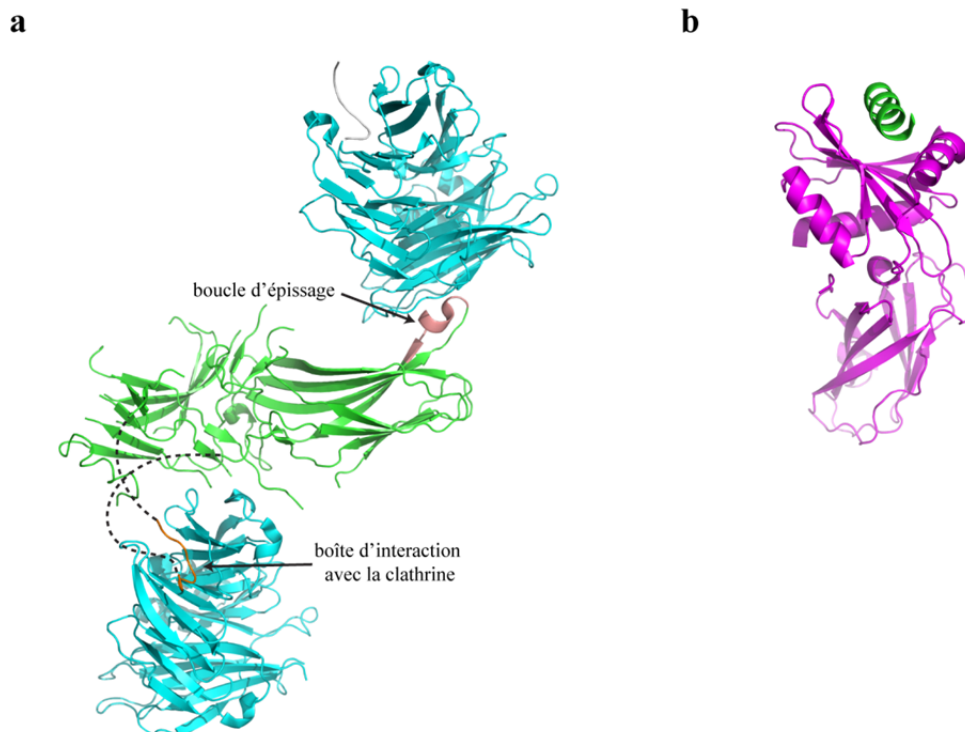


Figure 17. Échafaudages de l'AP2 et de la clathrine sur les β arrs. a) Représentation en ruban de l'interaction entre la chaîne lourde de la clathrine (bleu pâle) avec la forme longue de la β arr1 (vert). Les résidus 334-341 (boucle d'épissage) et 373-377 (boîte d'interaction avec la clathrine) de la β arr1 forment deux sites distincts d'interaction. Les résidus 373-380 de la β arr1 incluant la boîte d'interaction avec la clathrine sont colorés en orange (pdbid: 3gc3). La boucle d'épissage est colorée en saumon (pdbid: 3gd1). Les lignes pointillées représentent la position possible de la chaîne principale reliant les résidus 373-380 avec le restant de la structure de la β arr1. b) Représentation en ruban de l'interaction entre la queue C-terminale de la β arr1 (vert) et la sous-unité β 2 de la protéine adaptatrice AP2 (magenta, pdbid: 2iv8).

Rôles des modifications post-traductionnelles dans l'adressage des RCPGs

Ubiquitination

L'ubiquitination est importante pour l'endocytose, l'adressage post-endocytaire et la signalisation des récepteurs (Shenoy, 2007). Plus particulièrement, l'ubiquitination des

RCPGs n'est pas requise pour l'endocytose mais plutôt pour leur adressage post-endocytaire vers la dégradation dans les lysosomes. Les RCPGs peuvent être monoubiquitinés, multiubiquitinés ou polyubiquitinés selon le récepteur. Par exemple, les récepteurs CXCR4, PAFR et PAR2 sont monoubiquitinés alors que les récepteurs β 2AR, V2R et NK1R sont multi- ou polyubiquitinés (Shenoy, 2007). Pour la plupart des récepteurs incluant le récepteur aux chimiokines de motif CXC de type 4 (CXCR4) (Marchese et al., 2003), le récepteur de l'albinisme oculaire de type 1 (OA1) (Giordano et al., 2011) et le récepteur PAR2 (Hasdemir et al., 2007), l'adressage aux lysosomes est dépendant de la reconnaissance des récepteurs ubiquitinés par le complexe de triage endosomal requis pour le transport (ESCRT) situé dans les vésicules intraluminales des corps multivésiculaires (MVB) des endosomes tardifs (Hurley and Hanson, 2010). Généralement, les β arrs servent d'échafaudage pour amener les E3 ubiquitine ligases aux récepteurs. Par exemple, la β arr2 recrute l'ubiquitine ligase nedd4 au récepteur β 2AR pour favoriser la dégradation du récepteur dans les lysosomes (Shenoy et al., 2008). De plus, l'ubiquitination du V2R est aussi dépendante de la β arr2 et régule la vitesse de dégradation mais pas l'endocytose du récepteur (Martin et al., 2003). L'ubiquitination est un processus réversible et les β arrs peuvent engager les enzymes déubiquitinases aux récepteurs. Par exemple, la β arr2 amène les protéases des ubiquitines spécifiques aux ubiquitines de type 20 (USP20) et de type 33 (USP33) au β 2AR afin d'enlever l'ubiquitine, diminuer l'adressage au lysosome et favoriser le recyclage ainsi que la resensibilisation du récepteur (Berthouze et al., 2009). De plus, la E3 ubiquitine ligase du lymphome de la lignée B de casitas (c-Cbl) et la déubiquitinase de la molécule associée avec le domaine de la molécule adaptatrice transductrice du signal homologue à Src de type 3 (AMSH) et la déubiquitinase protéase de type Y spécifique à l'ubiquitine (UBPY) agissent sur PAR2 et régulent l'adressage aux lysosomes (Hasdemir et al., 2009). Étrangement, dans ce cas, l'ubiquitination du PAR2 réduit son adressage aux lysosomes suggérant que l'impact de l'ubiquitination sur l'adressage dépend du récepteur. Aussi, le rôle des β arrs dans l'action de ces protéines régulatrices de l'ubiquitination de PAR2 est inconnu.

En plus des RCPGs, les β arrs régulent l'ubiquitination d'autres protéines membranaires dont l'IGFR de type 1 (Girnita et al., 2005), le TRP de type 4 (Shukla et al., 2010), le NHE de type 1 (Simonin and Fuster, 2010), ainsi que des protéines régulatrices de la signalisation des

RCPGs comme GRK2 (Salcedo et al., 2006) et la PDE4D (Li et al., 2009a), et même des récepteurs nucléaires comme le récepteur aux androgènes (AR) (Lakshmikanthan et al., 2009) suggérant ainsi que les β arrs ont un rôle cellulaire important dans le contrôle de l'ubiquitination.

De manière intéressante, les β arrs sont elles-mêmes multiubiquitinées et les sites d'ubiquitination changent en fonction du récepteur, suggérant que l'ubiquitination des β arrs pourrait avoir des rôles cellulaires différents pour chaque récepteur (Shenoy and Lefkowitz, 2005). Généralement, l'ubiquitination des β arrs est importante pour l'endocytose des récepteurs. Par exemple, l'ubiquitination de la β arr2 par Mdm2 augmente sa liaison au β 2AR et à la clathrine, augmente la colocalisation du complexe β 2AR / β arr2 dans les endosomes, et est nécessaire pour l'endocytose du récepteur (Shenoy et al., 2007; Shenoy et al., 2001; Shenoy et al., 2009). De plus, l'ubiquitination des β arrs corrèlent avec le patron d'adressage des RCPGs. En effet, les β arrs engagées par les récepteurs qui recyclent (classe A), sont ubiquitinées de manière transitoire. Au contraire, les β arrs engagées par les récepteurs de classe B qui sont dégradés aux lysosomes sont ubiquitinées de manière soutenue (Shenoy, 2007). Ainsi, la déubiquitination de la β arr2 semble être requise pour le recyclage du β 2AR qui peut être bloqué par la co-transfection du récepteur avec une protéine de fusion entre une β arr2 et l'ubiquitine (Shenoy and Lefkowitz, 2003). De plus, l'ubiquitination des β arrs est impliquée dans la signalisation des récepteurs. Pour ce faire, l'ubiquitination soutenue des β arrs stabilise la formation de signalosomes intracellulaires engageant les ERK1/2 (Shenoy and Lefkowitz, 2005). Par exemple, la déubiquitinase USP33 qui interagit avec la β arr2 pour enlever les ubiquitines, inhibe l'activité ERK2 induite par le β 2AR (Shenoy et al., 2009).

Sumoylation

Il n'y a que peu d'études qui décrivent la sumoylation des RCPGs. D'abord, le 5-HT1A est sumoylé après traitement par un agoniste. Puisque le 5-HT1A sumoylé est inactif et localisé dans les endosomes, il a été proposé que la sumoylation est impliquée dans l'internalisation et la désensibilisation de ce récepteur (Li and Muma, 2013). Au contraire, la stimulation du CB1 par l'agoniste partiel Δ 9-tétrahydrocannabinol (Δ 9-THC) diminue la

sumoylation du récepteur (Gowran et al., 2009). Un 3^{ème} RCPG, le récepteur métabotrope au glutamate de type 8 (mGluR8), est sumoylé sur K882 de la queue C-terminale (Tang et al., 2005). Cependant, les rôles précis de la sumoylation de CB1 et mGluR8 ne sont pas connus.

En plus des récepteurs, certains effecteurs des RCPGs sont sumoylés. Ainsi, la sumoylation de la β arr2 sur la K200 est requise pour l'endocytose du β 2AR induit par un agoniste (Wyatt et al., 2011). De plus, elle affecte l'interaction entre la β arr2 et AP2, mais pas son engagement avec le récepteur indiquant que la sumoylation agit en régulant le recrutement de la machinerie d'endocytose. Trois autres effecteurs, la calvéoline de type 3, RGSZ1 et RGSZ2 sont sumoylés (Fuhs and Insel, 2011). La sumoylation de la calvéoline-3 affecte la désensibilisation du β 2AR alors que celle des RGSZ1 et 2 augmente leur association avec les sous unités $G\alpha$ et probablement la désensibilisation du μ OR dans le cerveau des souris (Rodriguez-Munoz et al., 2007). Ensemble, ces études suggèrent que la sumoylation joue un rôle important dans la régulation des RCPGs.

Phosphorylation des β arrs

En plus de la phosphorylation des RCPG discutée plus haut, certains de leurs effecteurs peuvent aussi être régulés par phosphorylation. Ainsi, un cycle de phosphorylation et déphosphorylation régule certaines fonctions des β arrs associées aux RCPGs. D'abord phosphorylées dans le cytoplasme, les β arrs sont rapidement déphosphorylées par leur recrutement à un récepteur (Lin et al., 1997; Lin et al., 2002) pour ensuite être rephosphorylées par des protéines kinases spécifiques. Les sites de phosphorylations diffèrent entre la β arr1 et 2. Par exemple, suite à l'activation du β 2AR, ERK1/2 phosphoryle le résidu S412 de la queue C-terminale de la β arr1, inhibant l'endocytose du récepteur, la liaison de c-Src à la β arr1 et l'activité MAPK, sans affecter la désensibilisation ni l'interaction du récepteur avec la β arr1 (Luttrell et al., 1999; Lin et al., 1999; Lin et al., 1997). De manière similaire, la S412 de la β arr1 est phosphorylée par GRK5 après activation du récepteur à la sérotonine de type 4 (5-HT4) indiquant que les protéines kinases impliquées pourraient être spécifiques pour chaque récepteur. La β arr1 phosphorylée inhibe alors l'activation de ERK1/2 par le 5-HT4 en inhibant l'activité de c-Src engagée par le récepteur (Barthet et al., 2009).

Aussi, la PP2A semble être responsable d'une partie de la déphosphorylation du résidu S412 de la β arr1 (Hupfeld et al., 2005). Un autre résidu sur la β arr1, la Y54, est phosphorylé par c-Src ce qui diminue l'interaction de β arr1 avec la sous-unité μ d'AP2 inhibant ainsi l'endocytose du β 2AR activé (Marion et al., 2007). La phosphorylation de deux résidus de la β arr2, T383 par la kinase de la caséine de type 2 (CKII) et S361 par une kinase inconnue, pourrait inhiber l'endocytose du β 2AR sans affecter sa désensibilisation (Lin et al., 2002). Cependant, l'impact de la phosphorylation du résidu T383 sur l'endocytose du β 2AR est contesté dans une étude similaire (Kim et al., 2002). La différence des résultats obtenus dans ces 2 études pourrait être expliquée par les différentes espèces de β arr2 utilisées. Toutefois, d'autres rôles de la phosphorylation de la β arr2 par CKII ont été décrits comme le blocage de l'effet inhibiteur de la β arr2 sur l'activité de NF- κ B (Luan et al., 2005) ou bien l'inhibition de l'interaction entre β arr2 et TPR de type 1 (Por et al., 2013) indiquant que la CKII régule les fonctions de la β arr2. Ensemble, ces études démontrent que l'activité des β arrs est régulée par des kinases qui déterminent leurs états de phosphorylation et que, généralement, la phosphorylation inactive les β arrs.

Nitrosylation

La β arr2 est S-nitrosylée sur le résidu C410 grâce à son interaction avec la syntase d'oxide nitrique endothéliale (eNOS) suite à la stimulation du β 2AR. Cette modification augmente l'association de la β arr2 avec les effecteurs de l'endocytose, la clathrine et la β -adaptine, potentialisant ainsi l'internalisation du β 2AR (Ozawa et al., 2008). Ainsi, contrairement à la phosphorylation, la nitrosylation de la β arr2 a un effet activateur sur son activité. La nitrosylation de certains RCPG comme le β 2AR a aussi été décrit comme étant un régulateur de sa signalisation (Adam et al., 1999).

Ensemble, ces études suggèrent que les modifications post-traductionnelles des RCPG et de leurs effecteurs comme les β arrs constituent un code de régulation de leur activité. Puisque la nature des modifications dépend de la spécificité de l'engagement enzymatique à certains récepteurs et effecteurs ainsi que leur expression cellulaire, ce phénomène pourrait

contribuer à tisser un filage signalétique distinctif pour un tissu et un système cellulaire particulier.

Structure tridimensionnelle des RCPGs

La nature membranaire hydrophobique et les multiples modifications post-traductionnelles des RCPGs rendent difficiles leur purification homogène à des concentrations utiles pour la résolution des structures tridimensionnelles. Ainsi, malgré les efforts importants sur plusieurs décennies, la première structure d'un RCPG n'a été publiée qu'en l'an 2000 (Palczewski et al., 2000). Il s'agit de la structure de la rhodopsine, le récepteur de la lumière qui est naturellement très abondant dans les cellules du système visuel et qui possède un ligand lié de manière covalente, contrairement aux autres RCPG existants qui lient des ligands diffusibles, ce qui aide à la stabilisation du récepteur. Ainsi, il a fallu attendre 7 années supplémentaires avant que des évolutions importantes dans les méthodes de stabilisation et de cristallisation des protéines membranaires permettent la résolution de la structure cristalline du premier récepteur liant les ligands diffusibles, le β 2AR (Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007; Rasmussen et al., 2007). Ces avancées technologiques ont provoqué une explosion de structures cristallines permettant de confirmer et de préciser plusieurs hypothèses sur la structure générale ainsi que le mode de liaison et d'activation des récepteurs. L'annexe 2 (Audet and Bouvier, 2012)(page iii de la section annexe) présente une revue que j'ai publiée en 2012 dans le journal *Cell* et qui décrit les motifs structuraux importants impliqués dans la transition allostérique des récepteurs lors de l'activation, l'effet allostérique du couplage avec la sous-unité $G\alpha_s$ et le rôle de la liaison des ligands dans l'activation des récepteurs. Depuis la publication de cet article, 10 autres structures de RCPGs ont été publiées et sont indiquées dans le tableau III (page 78 de la section introduction). Ces études montrent une diversité importante dans les modes de liaison des ligands qui, combinés avec les relations entre la structure et l'activité des ligands, suggèrent différents mécanismes possibles de transition allostérique entre le site de liaison et la conformation intracellulaire des récepteurs. Par contre, les RCPGs semblent conserver les motifs importants impliqués dans des changements conformationnels liés à l'activation des protéines G hétérotrimériques, comme l'ouverture du

TM6, indiquant que les RCPGs ont évolués en développant des mécanismes divergent permettant aux ligands d'initier l'activation des récepteurs, mais dont les mouvements globaux demeurent similaires. Ainsi, les récepteurs peuvent intégrer les signaux de milliers de ligands différents afin d'activer quelques effecteurs dont une douzaine de protéines G à l'aide d'une topologie conservée.

La détermination des structures cristalline de RCPGs est très importante pour la compréhension de la transmission du signal car elles fournissent la carte des interactions entre les résidus d'un récepteur, ainsi que celle des interactions entre un ligand et un récepteur. Ainsi, une structure permet de rationaliser des hypothèses plausibles et vérifiables sur l'implication de certains résidus dans la signalisation induite par un ligand. Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance d'assister à la publication de la structure cristalline du $\beta 2AR$, un des 1^{er} récepteur prototypique où le concept d'efficacité multidimensionnelle a émergé (Galandrin and Bouvier, 2006). Ainsi, à cette époque, beaucoup d'informations sur l'efficacité des ligands de ce récepteur étaient déjà disponibles faisant du $\beta 2AR$ un excellent candidat pour l'étude des déterminants moléculaires de la signalisation. Dans ma thèse, j'ai donc pris avantage de cette opportunité d'étudier les déterminants de l'efficacité des β -bloqueurs notamment en simulant leur liaison sur la seule structure cristalline du $\beta 2AR$ disponible à l'époque (article 1, page 86 de la section résultats).

Tableau III. Liste des structures cristallines récentes de RCPG.

Noms	Numéro PDB	Année	Résolution (Å)	Espèce	commentaires	référence
Adenosine A _{2A}	4EIY	2012	1.8	humain	lié à l'antagoniste ZM241385	(Liu et al., 2012)
PAR1	3VW7	2012	2.2	humain	lié à l'antagoniste vorapaxar	(Zhang et al., 2012)
5-HT1B	4IAR	2013	2.7	humain	lié à l'agoniste ergotamine	(Wang et al., 2013a)
	4IAQ	2013	2.8	humain	lié à l'agoniste dihydroergotamine	
5-HT2B	4IB4	2013	2.7	humain	lié à l'agoniste ergotamine	(Wacker et al., 2013)
SMO	4JKV	2013	2.5	humain	lié à l'antagoniste LY2940680	(Wang et al., 2013b)
β1AR	4GPO	2013	3.5	dinde	sans ligand, état basal	(Huang et al., 2013)
β1AR	3ZPQ	2013	2.8	dinde	lié au composé 1	(Christopher et al., 2013)
β1AR	3ZPR	2013	2.7	dinde	lié au composé 2	
GR	4L6R	2013	3.3	humain	sans ligand ni 122 acides aminés du N-terminal, classe B	(Siu et al., 2013)
CRF1	4K5Y	2013	3.0	humain	lié à l'antagoniste CP-376395, sans les 114 acides aminés du N-terminal, T4L inséré dans la BI2, classe B.	(Hollenstein et al., 2013)

Composé 1 = 4-(piperazin-1-yl)-1H-indole; composé 2 = 4-méthyl-2-(piperazin-1-yl)-quinoline; PAR1 = récepteur activé par les protéases de type 1; 5-HT1B = récepteur à la sérotonine de type 1B; 5-HT2B = récepteur à la sérotonine de type 2B; SMO = récepteur smoothened; GR = récepteur au glucagon; CRF1 = récepteur au facteur de relâche de la corticotropine de type 1; T4L = lysozyme T4.

Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET)

Généralités et principes

L'analyse de la signalisation d'un RCPG doit maintenant tenir compte de l'engagement de plusieurs effecteurs et de la mobilisation de plusieurs voies de signalisation. Les méthodes traditionnelles de mesure d'association d'effecteurs ou de signalisation sont parfois peu sensibles pour certains systèmes et requiert souvent une grande quantité de travail, rendant incompatible l'analyse des interactions à plus grande échelle. Ainsi, ces dernières années, il y a eu beaucoup de développement de nouvelles technologies menant à l'apparition d'essais en

laboratoire augmentant la sensibilité et la vitesse de lecture d'un signal. Dans notre laboratoire, nous avons développé plusieurs essais utilisant le transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET). Le BRET est un phénomène naturel retrouvé notamment dans les différents organismes océaniques comme ceux de l'espèce *Renilla reniformis*. Ces derniers émettent un rayonnement lumineux centré à 480 nm environ provenant de l'oxydation catalytique d'un substrat, la coelenterazine, par l'enzyme *renilla* luciférase (RLuc) (Hastings and Wilson, 1976). Une GFP, liée fermement mais de manière non-covalente à la luciférase, est excitée en captant de manière non-radiative (avant l'émission du photon par la coelenterazine) une partie de l'état d'excitation de la coelenterazine et émet à son tour un rayonnement centré à 515 nm (Tsien, 1998). Le phénomène spectroscopique de transfert d'énergie non-radiative est produit par le couplage électrostatique entre le dipôle de l'état électronique excité du donneur d'énergie et le dipôle de l'état de base de l'accepteur d'énergie et a été décrit pour la première fois par le physicien allemand Theodor Förster en 1948 (Förster, 1948). L'intensité du transfert énergétique dépend du chevauchement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'absorption de l'accepteur, de l'orientation relative du donneur par rapport à l'accepteur et de l'inverse de la distance les séparant, à la puissance 6. C'est grâce à cette dernière caractéristique que le BRET est utilisé pour mesurer différents phénomènes cellulaires, notamment l'association de macromolécules. Pour ce faire, la RLuc et la GFP sont fusionnées à deux protéines d'intérêts dont l'association induit la proximité nécessaire pour provoquer le transfert non-radiatif (figure 18, page 80 de la section introduction). Ainsi, le ratio entre l'émission de lumière provenant de la GFP divisé par celle provenant de la luciférase est généralement utilisé pour évaluer le transfert énergétique et l'association des deux macromolécules d'intérêts. Le BRET a déjà été utilisé pour étudier la dynamique d'association et de dissociation des complexes protéiques formés par l'activation des RCPG, notamment entre les β arrs, les protéines G hétérotrimérique et les récepteurs, mais aussi pour étudier les changements conformationnels associés à l'activation des ces effecteurs (Hamdan et al., 2005; Zimmerman et al., 2012; Charest et al., 2005; Gales et al., 2006; Gales et al., 2005; Breton et al., 2010)(annexe 3, page iv de la section annexe)(annexe 4, page v de la section annexe).

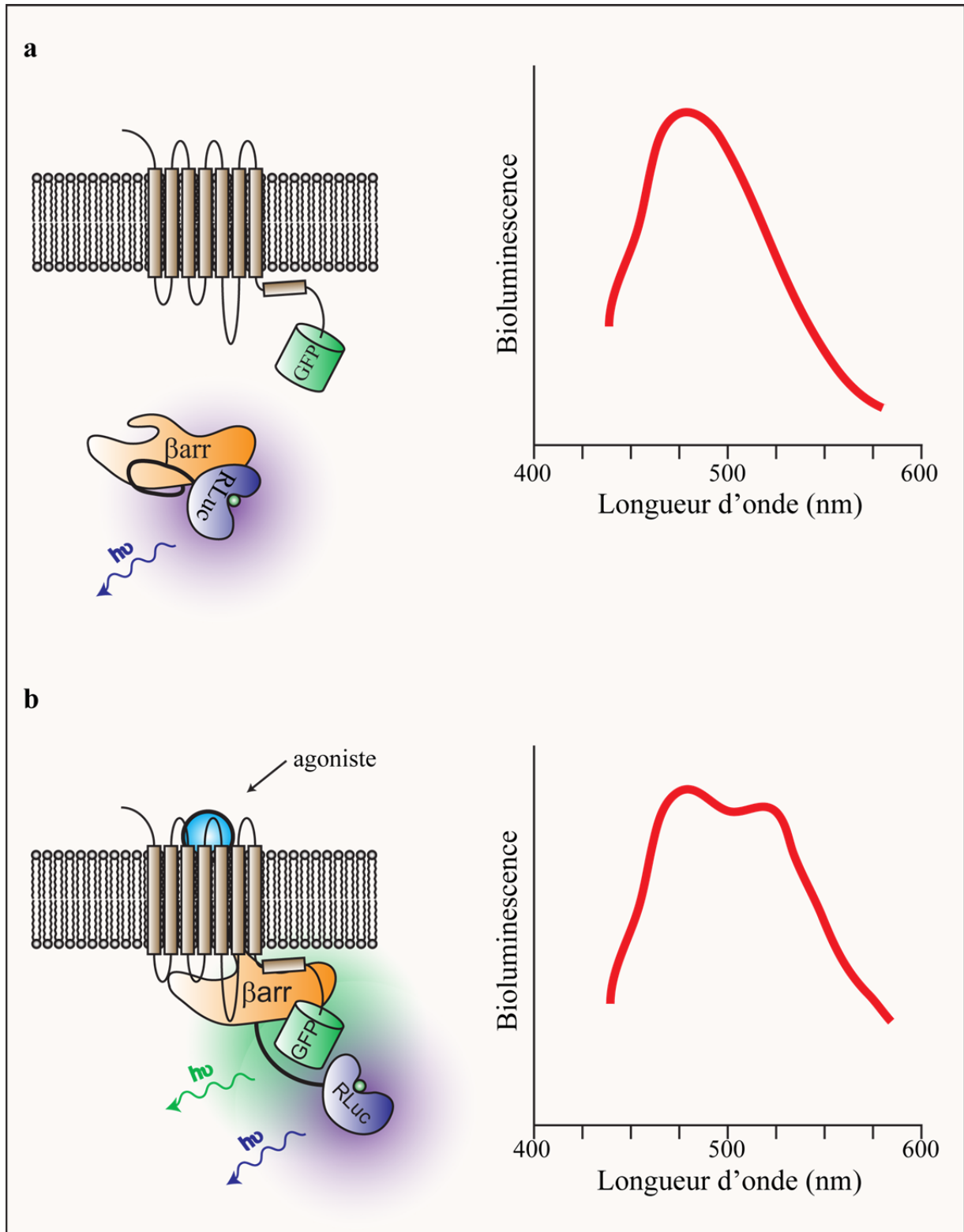


Figure 18. Principes du BRET. Exemple d'utilisation du BRET pour mesurer une interaction entre 2 protéines d'intérêts. Une RLuc et une GFP sont fusionnées à une β arr et un RCPG

respectivement. a) En l'absence de stimulation, la coelentérazine associée à la *RLuc* émet un rayonnement bleu (varie entre 420-480 nm selon les coelentérazines). b) Après stimulation du récepteur par un ligand, la β arr est recrutée ce qui induit une proximité entre la *RLuc* et la GFP. Une partie de l'énergie d'excitation de la coelentérazine lié à la *RLuc* est transférée de manière non-radiative à la GFP qui émet alors un rayonnement vert / jaune (510-530 nm pour les variantes de GFP les plus utilisées). L'apparition du rayonnement provenant de la GFP indique que la β arr est engagée dans un complexe avec des récepteurs actifs.

Applications du BRET dans des modèles cellulaires et physiologiques

Le BRET a surtout été utilisé pour mesurer des complexes moléculaires en temps réel *in vitro* (Michelini et al., 2004; Kim et al., 2009) et dans des cellules en culture (Hamdan et al., 2007; Angers et al., 2000; Azzi et al., 2003). Cet essai est expérimentalement homogène car il ne requiert souvent que l'ajout du substrat et la lecture du signal par un détecteur. Cette propriété est recherchée notamment dans les campagnes de criblage à haut débit (HTS) et plusieurs nouveaux ligands de macromolécules ont été identifiés grâce au développement du BRET en HTS (Vrecl et al., 2004; Hamdan et al., 2005; Corbel et al., 2011)(annexe 4, page v de la section annexe). Aussi, la biocompatibilité de la coelenterazine permet d'appliquer le BRET *in vivo*, en injectant des cellules exprimant des biosenseurs BRET dans des souris (Dragulescu-Andrasi et al., 2011; De et al., 2009; De et al., 2007; Huang et al., 2007; De and Gambhir, 2005), ou détectant le signal sur des jeunes pousses de plantes de tabac et d'*Arabidopsis* qui expriment de manière stable les partenaires BRET (Xu et al., 2007; Subramanian et al., 2006; Xie et al., 2011). Cependant, la détection du signal BRET sur des organismes complexes comme les souris dont les tissus absorbent la lumière visible est difficile. Des stratégies utilisant une fibre optique implantée dans la peau (Huang et al., 2007), des caméras refroidies avec détecteur couplé à la charge (CCD) très sensible (De and Gambhir, 2005; De et al., 2007; De et al., 2009; Dragulescu-Andrasi et al., 2011) et des couples donneur / accepteur avec des propriétés spectrales biocompatibles et plus performantes (De et al., 2009; So et al., 2006; De et al., 2007; Dragulescu-Andrasi et al., 2011) ont été tentées pour augmenter la sensibilité de la détection du signal BRET. De manière similaire, le faible

rendement de l'émission lumineuse de la *RLuc* par rapport à un fluorophore excitée par une source lumineuse directe (Inouye and Shimomura, 1997) complique la détection du signal de BRET sur une cellule unique par microscopie. À cette fin, l'usage de caméra CCD refroidit ainsi que l'optimisation de l'optique est nécessaire pour obtenir des micrographes en BRET (Xie et al., 2011; De et al., 2009; Coulon et al., 2008; Moutin et al., 2012b; Moutin et al., 2012a; De et al., 2007). Toutefois, si le signal de bioluminescence peut être détecté, l'absence d'excitation directe des échantillons par une source lumineuse intense, comme dans le cas des méthodes de fluorescence, permet au BRET de n'avoir virtuellement aucun bruit de fond induit par la dispersion non-spécifique de la lumière sur les échantillons. Il s'agit d'un avantage important par rapport aux autres méthodes spectroscopiques, surtout dans le contexte de la mesure d'un signal sur le tissu d'un animal et ou au microscope. Toutefois, au commencement de cette thèse, l'utilisation du BRET pour mesurer la dynamique d'une interaction protéine-protéine dans un contexte de souris transgénique et la localisation subcellulaire d'une interaction au microscope n'avait jamais été réalisée. Ainsi, nous avons donc voulu développer ces approches afin de mieux étudier les étapes d'activation d'un RCPG ainsi que l'interaction avec ses effecteurs.

Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre les déterminants moléculaires et les impacts de la signalisation biaisée des RCPGs. Jusqu'à tout récemment, les détails moléculaires de la liaison des différents ligands et de la transition allostérique lors de l'activation du récepteur étaient peu connus. La publication récente de structures cristallines des RCPGs liant les ligands diffusibles offre une occasion de mieux comprendre les déterminants moléculaires de la liaison des ligands biaisés sur les récepteurs et de leur efficacité. Ainsi, le premier sous-objectif de cette thèse est de mieux définir les déterminants de la signalisation biaisée au niveau de la liaison de ligands au récepteur. Les effecteurs signalétiques des RCPGs les plus caractérisés, mise à part les protéines G hétérotrimériques, sont les β arrs. Malheureusement, il n'y a que peu d'outils disponibles pour obtenir une véritable compréhension de leurs rôles cellulaires et physiologiques. D'une part, les fonctions des β arrs sont conférées par l'échafaudage de partenaires signalétiques et la localisation cellulaire des complexes. Or, la plupart des techniques de microscopies ne permettent pas de déterminer avec précision les complexes moléculaires. De plus, la détection d'un complexe protéine-protéine dans un tissu animal requiert des méthodes biochimiques qui souvent dénaturent le contexte de l'interaction. D'autre part, il n'existe aucun inhibiteur pharmacologique des β arrs et leur étude dépend souvent d'outils génétiques qui ne permettent pas leur inactivation rapide. Ainsi, le développement d'approches permettant la détection des interactions protéines-protéines impliquant les β arrs de manière subcellulaire et dans un contexte natif, de même que le développement d'outils pharmacologiques permettant l'inhibition rapide des β arrs, sont importants pour mieux comprendre la signalisation des RCPGs dépendante des β arrs. Ainsi, le 2^e sous-objectif de cette thèse est de développer des outils qui permettraient de mieux caractériser les rôles cellulaires et physiologiques des β arrs dans le contexte de leur activation par des RCPGs.

Objectifs spécifiques

- 1) Analyser les déterminants moléculaires de la liaison de ligands biaisés du β 2AR à l'aide de la structure cristalline du récepteur lié au carazolol (article 1, page 86 de la section résultats).
- 2) Utiliser les déterminants de la liaison de ligands biaisés du β 2AR pour identifier des régions du récepteur qui sont impliquées dans l'efficacité des β -bloqueurs (article 1, page 86 de la section résultats).
- 3) Développer l'utilisation du BRET en microscopie pour visualiser l'engagement des β arrs par les RCPGs, afin d'obtenir un essai plus quantitatif et dynamique que les techniques traditionnelles de microscopie de fluorescence qui sont classiquement plus qualitatives (article 2, page 109 de la section résultats).
- 4) Développer l'utilisation du BRET dans un modèle de souris transgénique afin de détecter l'engagement des β arrs aux RCPGs dans un contexte natif (article 3, page 132 de la section résultats).
- 5) En combinant des essais de criblage virtuel et d'essais de validation cellulaire, identifier des petits composés organiques inhibant les β arrs afin d'étudier pharmacologiquement leurs fonctions cellulaires et physiologiques dans le contexte de la signalisation et de l'adressage des RCPG (article 4, page 166 de la section résultats).

Résultats

Article 1

Insights Into Signaling from the β_2 -Adrenergic Receptor Structure

Martin Audet and Michel Bouvier

Nature Chemical Biology, Jul;4(7):397-403, (2008)

Contexte / objectifs: À la fin de l'année 2007, la publication de la structure cristalline à haute résolution du β_2 AR a constitué un avancement majeur dans le domaine de la biologie structurale des RCPGs et ouvre des perspectives importantes dans la compréhension de leur mode d'activation. Peu de temps après, nous avons publié un article de type perspective dans la revue *Nature Chemical Biology* qui discute de la structure de certains éléments du récepteur comme les boucles extracellulaires, le motif DRY et la deuxième boucle intracellulaire, dans le contexte de la liaison des ligands, du mode d'activation du récepteur et de sa signalisation multidimensionnelle. De plus, nous avons arrimé de manière virtuelle des ligands du β_2 AR et comparé les modes de liaison prédits avec leur l'efficacité sur les voies d'accumulation d'AMPC et d'activation des MAPK. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence une corrélation entre les modes de liaison prédits pour les ligands et leurs patrons d'efficacité sur ces voies de signalisation. De plus, ces observations et analyses ont permis d'énoncer plusieurs hypothèses notamment concernant le rôle de certains résidus dans la signalisation du β_2 AR et ont notamment guidé des études de mutagénèse pour mieux connaître les déterminants moléculaires de l'efficacité de signalisation (figures 19 et 25, pages 210 et 222 de la section discussion).

Contribution: Dans cet article, j'ai conçu et réalisé toutes les expériences de simulation informatique et participé à l'écriture du manuscrit.

Insights Into Signaling from the β_2 -Adrenergic Receptor Structure

Martin Audet and Michel Bouvier

Abstract

With more than 800 members, the G protein-coupled receptor family constitutes the largest group of membrane protein involved in signal transduction. Until the end of last year, high resolution three dimensional structures were available for only one of them, the light receptor rhodopsin. Recently the structure of the β_2 -adrenergic receptor has been obtained and revealed interesting differences with the structure of rhodopsin. Analyses of these differences raise important questions about the binding modes of diffusible ligands in the receptor and allow formulating testable hypotheses about the structural determinants linking drug binding to specific signalling responses. Using the three dimensional structure derived from the β_2 -adrenergic receptor crystal, virtual docking of ligands with distinct activities suggested different binding modes that correlated with their reported efficacy profiles, thus allowing to make predictions about the structural determinants of drug signalling efficacies.

Almost twenty five years after its purification¹, the three dimensional structure of one of the most studied G protein-coupled receptors (GPCRs), the human β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR), was revealed in a series of elegant protein chemistry and crystallography studies carried out by the Kobilka group at Stanford in collaboration with the laboratories of Schertler in the UK² and Stevens in the US^{3,4}. Although two high resolution structures of another prototypical serpentine receptor, the bovine visual pigment rhodopsin, had previously been obtained^{5,6}, the three dimensional structure of a GPCR that binds diffusible ligands, such as hormones and neurotransmitter, was eagerly awaited.

GPCRs bind a large diversity of ligand types including mono-amines, small peptides, glycolipids, lipids, nucleotides and nucleosides and control many distinct physiological responses going from cell growth and differentiation to complex biological responses controlling cardiovascular function, metabolism, immune responses and neurotransmission among others. This wide functional diversity and their readily accessible location at the cell surface make of the GPCRs the largest class of tractable targets for the development of therapeutic drugs. Although ~50% of the existing drugs already target GPCRs for their therapeutic action it is generally believed that their therapeutic potential has only begun to be exploited. It was thus anticipated that solving the first structure of a diffusible ligand-binding GPCR would provide new insights into how natural transmitters and drugs regulate their signalling activity. As will be discussed below, our hopes were not disappointed.

In classic representations, the basic transduction unit of GPCR comprises three elements: 1) a 7 transmembrane domains receptor which binds the ligand; 2) a hetero-trimeric ($\alpha\beta\gamma$) G protein, and 3) an effector that can be an enzyme, a channel or a transporter whose activities are regulated by the G protein. In general, drugs binding at GPCR were believed to act exclusively by promoting or blocking the activation of a given G protein. However, an increasing body of evidence shows that in addition to interact with more than one type of G proteins, GPCRs can interact directly and modulate the activity of a growing list of signalling partners independently from the G proteins⁷. Among these, β arrestins have attracted considerable attention. Originally discovered for their role in the desensitization of the receptors⁸, β arrestins are now recognized as scaffolding proteins that can engage a diversity of signalling molecules⁹. In particular, β arrestins have been shown to play a central role in the G protein-independent activation of

the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade¹⁰. Thus, it is increasingly clear that, rather than functioning as toggle switches that can turn on or off pre-selected linear signalling cascades, GPCRs are more akin to signalling hubs that can regulate alternative subsets of signalling modes, depending on the receptor conformations stabilized by specific ligands. For instance, the β_2 AR engages both the stimulatory and inhibitory G proteins Gs and Gi to control the adenylyl cyclase (AC) activity¹¹ and MAPK¹². In addition, the recruitment of β arrestin to the β_2 AR can lead to the activation of MAPK independently of G protein activation¹². Interestingly, as illustrated in Fig. 1 and discussed in more details below, different ligands were found to selectively favour a given signalling cascade over the others¹³.

The capacity of different ligands to promote distinct conformational rearrangements of the β_2 AR has been clearly established by monitoring fluorescent properties of intra-molecular probes within purified receptors^{14,15} as well as using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) biosensors, monitoring the conformational rearrangements of receptor complexes¹⁶. These studies provided information about ligand-specific conformational rearrangements in general terms but did not offer direct information at the atomic level on the binding modes of the ligands or how these ligands could stabilize distinct conformations leading to different signalling pathways. The high resolution structures obtained from the crystallized β_2 AR start providing answers to these questions.

Why did it take so long?

The many years which elapsed between the purification of β_2 AR and the elucidation of its high resolution 3D structure is a good reflection of the difficulties that had to be overcome. Even after the path had been paved by the determination of the crystal structure of rhodopsin⁶, it took seven years before the β_2 AR revealed its structural secrets. One difficulty stemmed from the fact that, in contrast to rhodopsin which is the most abundant membrane protein of the retina, hormone and neurotransmitter receptors are generally expressed at very low concentration making it difficult to generate the large quantities of proteins needed to obtain diffracting crystals. When sufficient quantities of proteins were finally produced by over-expressing the receptors in specialized systems such as the insect Sf9 cells, obtaining high

concentrations of a homogeneous population of functional receptors still remained a challenge. Even when sources of micro-heterogeneity such as putative phosphorylation sites and carbohydrate attachment sites were eliminated and a ligand-binding affinity chromatography step was included in the purification scheme to enrich for functional receptors, it remained impossible to obtain diffracting crystals, largely due to the instability of the receptor itself.

This inherent instability is most likely a result of the structural flexibility required for the receptor to adopt the various conformations needed to generate distinct signalling outputs in response to different ligands. The third intracellular loop (ICL3) is a particularly flexible domain that links trans-membrane domain 5 (TM5) and TM6 and is involved in G protein engagement. Two different strategies were designed to stabilize ICL3. In one case, an antibody Fab fragment recognizing a three dimensional epitope comprising the N- and C-terminal ends of ICL3 was bound to the receptor. In the other case, ICL3 was deleted and replaced by the well folded soluble T4-lysozyme (T4L). In both cases, the proteins were further stabilized by binding to the β -adrenergic inverse agonist, carazolol. Crystals were grown for both the β_2 AR-Fab complex and the β_2 AR-T4L fusion protein and diffraction data were obtained at 3.4Å/3.7Å and 2.4Å resolution respectively. Despite the lower resolution and the partially hidden third loop of the β_2 AR-Fab crystal, the two structures revealed very similar features.

As can be appreciated from the above discussion, stabilizing the receptor structure was crucial for obtaining diffracting crystals. In a case of just returns, the structure of the receptor now provides information that should help design new engineering strategies to stabilize GPCRs without having to truncate domains or bind or insert large stabilizing proteins. The identification of the side chain interactions involved in helix packing should help suggest mutations that could constrain helix movements and thus stabilize receptors. Consistent with this notion, Roth *et al.* showed in a recent study that mutation of the TM3 surface-exposed Glu122 to tryptophan or tyrosine enhanced the isothermal stability of the β_2 AR¹⁷. Also, a sophisticated mutation scan analysis of the turkey β_1 AR structure allowed Serrano-Vega *et al.* to identify 6 mutations which, when combined, greatly stabilize the receptor structure¹⁸. Most certainly, the resolved structure of the β_2 AR will help identify additional stabilizing mutations

for the β_2 AR and other closely related monoamine receptors allowing the easier production of stable proteins that will be amenable for crystallization and x-ray diffraction analysis.

Insights into binding and activation modes of the β_2 AR

Binding of a diffusible inverse agonist

The overall fold found for the β_2 AR structures are very similar to those previously published for rhodopsin (Fig. 2). However, several differences shed light on the functional characteristics of the receptor. One of these differences pertains to the nature of the ligands controlling receptor activity. In contrast to rhodopsin, whose activity is controlled by the isomerization of a covalently bound retinal molecule, ligands of the β_2 AR need to diffuse in and out of the receptor's binding pocket. So, maybe not surprisingly, the hairpin structure formed by two β -strands of the 2nd extra-cellular loop (ECL2) of rhodopsin that functions as a lid, shielding retinal from hydrolysis by the disc luminal milieu, is not present in the β_2 AR. In contrast, the ECL2 of β_2 AR forms an α -helix followed by a β -strand which is constrained by two disulfide bonds such that the binding pocket is readily accessible to the extracellular milieu allowing easy diffusion of water soluble ligands (Fig. 2). The highly structured ECL2, which is linked to the top of TM3 via a Cys191-Cys106 disulfide bond, was also found to directly contact the bound carazolol at Tyr199 and Phe193, suggesting a role for ECL2 in the control of ligand-binding selectivity and binding kinetics.

In recent years, 3D models based on rhodopsin-homology were generated for many GPCRs and used to make prediction on structure-activity relationships. Given the differences observed between the rhodopsin and β_2 AR structures, it will be interesting to see how the new structure will help refine these predictions, in particular concerning ligand binding.

Active or inactive conformation

Classically, drugs acting on GPCR were classified into two main categories, agonists and antagonists that, respectively, promote or block receptor activation. However, the recognition that GPCR can exhibit constitutive activity led to the discovery of a third class of

compounds able to decrease such spontaneous activity; inverse agonists¹⁹⁻²². In the framework of a two-state model whereby receptors are in equilibrium between inactive (R) and active (R*) conformations, agonists and inverse agonists stabilize R* and R, respectively. Neutral competitive antagonists for their part presumably compete for the binding of agonists or inverse agonists but do not affect the equilibrium, thus having no intrinsic activity^{23,24} (see Box 1). The structure solved for the β_2 AR was obtained in the presence of carazolol, an inverse agonist, and thus would be expected to be in an inactive conformation. However, in contrast to what was found for the inactive rhodopsin, the “ion lock” formed by the electrostatic interaction between Arg131 of the “DRY” (¹³⁰AspArgTyr) motif at the bottom of TM3 and Glu268 at the bottom of TM6 is open in β_2 AR (Fig. 3). This is intriguing for a structure that was stabilized in the presence of an inverse agonist (which should silence the constitutive activity of the receptor) because the opening of the “ionic lock” has been proposed to be a key feature in the activation of the receptor. Indeed, a large body of biochemical and pharmacological evidence indicate that mutations affecting the electrostatic interactions between Asp130, Arg131 and Glu268 allow an opening between TM3 and TM6 that increases the constitutive activity of the receptors²⁵.

Another triggering site that is linked to the opening between TM3 and TM6 is known as the “toggle switch.” In this switch, a cluster of aromatic residues in TM6 undergoes a rotamer change that alters the configuration of the Pro288 kink and allows the movement of the cytoplasmic side of TM6 away from TM3 upon activation permitting the opening of a cavity for G protein interaction and activation. As can be seen in Fig. 3b, the “toggle switch” is closed in the β_2 AR structure and can be perfectly overlaid with that of dark adapted rhodopsin, consistent with an inactive conformation of the receptor. Thus there is an apparent contradiction between the open state of the “ion lock” (leading to a separation between TM3 and TM6) and the closed state of the “toggle switch” in the inverse agonist-bound β_2 AR structure and the closed states for both the “ionic lock” and “toggle switch” in the inactive rhodopsin.

Rosenbaum et al.⁴ propose that the difference in the “ion lock” state between rhodopsin and the β_2 AR results from the fact that rhodopsin covalently bound to 11-*cis*-retinal is completely inactive whereas the unliganded β_2 AR spontaneously isomerizes between the

active and inactive conformation leading to constitutive signalling activity in the absence of agonist²¹. Since carazolol was proposed to be only a partial inverse agonist based on its incomplete inhibition of the spontaneous β_2 AR-stimulated AC activity⁴, the open state of the “ion lock” could reflect the residual constitutive activity of the receptor. This possibility is consistent with the observation that β_2 AR-T4L displays higher affinity for agonist binding than the wild type receptor; an indication that the fusion receptor used to generate the crystal structure may be more constitutively active. However, no such increase in agonist binding affinity was observed for the β_2 AR-Fab complex³ indicating no sign of increased constitutive activity for the antibody bound receptor. Yet, the “ionic lock” is also open in the β_2 AR-Fab fragment structure.

Multiple conformations and activation modes

Despite the conceptually satisfying two-state model of receptor activation described above, the thermodynamic formulation of the model already allowed for the existence of more than two receptor states²⁶ and increasing evidence indicates that different ligands can differentially regulate distinct activities of the receptor; a concept variously known as “ligand-directed trafficking of receptor signalling”, “functional selectivity”, “ligand-biased efficacy”, “collateral efficacy” or “pluridimensional efficacy”. This concept originally predicted on theoretical grounds in 1995²⁷ has recently been reviewed¹³. For example, β -adrenergic ligands that are inverse agonists toward the β_2 AR-stimulated AC activity can act as partial agonists for the β_2 AR-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity^{12,28}. Other ligands have been found to be agonists on both pathways, inverse agonists on both pathways or neutral antagonists for AC and partial agonists for MAPK signalling²⁹. These results are difficult to reconcile with a two state model of receptor activation and suggest that many distinct active receptor conformations can be differentially stabilized by various ligands with different signalling efficacy profiles toward different effector systems.

The existence of such ligand-specific receptor conformations, which is also supported by biophysical studies³⁰, offers an alternative explanation for the open “ion lock” position in the carazolol-bound β_2 AR crystal structures. Indeed, while inactive for a given signalling

pathway, some of these conformations could still be active for another one. Consistent with this notion, activation of the MAPK pathway by ligands that are inverse agonists for the β_2 AR-stimulated AC activity was found to be G protein-independent but β arrestin-dependent. As a result, one could imagine that the conformation stabilized by carazolol is inactive for the G protein dependent-regulation of AC but active for the β arrestin-dependent activation of MAPK. Whether carazolol can activate the MAPK in a β arrestin-dependent manner has not been experimentally tested yet. However, as will be discussed in more detail below, other β -adrenergic ligands found to be inverse agonists for AC but agonists for MAPK, are predicted to dock in the β_2 AR in a manner highly similar to that of carazolol suggesting that the latter may also activate MAPK. It could therefore be proposed that the “ion lock” opened, “toggle switch closed” conformation of the carazolol-bound β_2 AR allows β arrestin but not G protein engagement.

Although the precise site of interaction between the receptor and G proteins remains unknown, opening of the “ion lock” and separation between TM3 and TM6 has been proposed to expose a binding pocket for the G protein^{31,32}. It is therefore unclear why the carazolol-bound β_2 AR may not engage the G protein despite the ion lock opening (Fig. 3a) and separation between TM3 and TM6 (Fig. 3b). This could be explained in part by the restricted movement allowed to TM6 by the closed “toggle switch”. However, another difference between the rhodopsin and both β_2 AR-T4L and β_2 AR-Fab structures could help rationalized the findings. Indeed, the ICL2, which points outward for both active and inactive rhodopsin structures, is folded back toward the bottom of TM3 and the “DRY” motif for the carazolol-bound β_2 AR structures (Fig. 3a). A closer look at the position of ICL2 shows that Tyr141 at the tip of the loop interacts with Arg131 of the “DRY” motif, intercalating itself between Arg131 and Glu268 thus preventing the closure of the ionic-lock while filling the space between TM3 and TM6 through interactions with Phe264 (for the β_2 AR-Fab) or Glu268 (for the β_2 AR-T4L). From this representation, it is easy to envisage how Tyr141 could position ICL2 in a way that hindered the functional engagement of the G protein. Interestingly, phosphorylation of Tyr141 in response to insulin activation was previously found to regulate β_2 AR-stimulated AC^{33,34}, consistent with the possibility that this residue could have important

regulatory influence on β_2 AR-Gs coupling. It could be argued that Glu268 is forced away from its interaction with Arg131 due to a salt bridge interaction with Arg8 of the fused T4L thus creating an artifactual interaction between Tyr141 and Arg131. This is, however, very unlikely since a similar interaction is observed in the β_2 AR-Fab structure in which Glu268 is not stabilized away by an extraneous residue. Determining whether the position of Tyr141 and of ICL2 is a characteristic of a receptor bound by an inverse agonist preventing G protein activation but allowing β arrestin-mediated MAPK activation will require additional structures obtained in the presence or absence of ligands with different efficacy profiles.

Structural correlates of ligand-biased signalling

The availability of a true three dimensional representation of β_2 AR opens up multiple new avenues of investigation. Among these, virtual docking of small organic compounds onto the β_2 AR crystal coordinates allows the formulation of testable hypotheses about the molecular basis of ligand-biased signalling. The notion that different ligands could induce or stabilize different receptor conformations is compatible with the structures revealed by the β_2 AR crystals. Indeed, the roomy ligand binding cavity could easily accommodate several distinct binding modes triggering different activity states. Obviously, docking into a rigid structure will not allow to directly visualize the different conformations that could be induced by different ligands but could provide insights into some of the molecular correlates to signalling efficacy. Therefore, virtual docking of nine β -adrenergic ligands was performed on the rigid crystal structure of β_2 AR-T4L. Ligands were selected based on the availability of reported biased signalling activity and their chemical similarity to carazolol. The quality of the modeling and docking can be appreciate by the excellent superposition (RMSD= 0.85Å) between the structure obtained for carazolol *in silico* and the one observed in the crystal structure (Fig. 4a).

As can be seen in Fig. 4b-d, ligands that have distinct activities towards the β_2 AR-stimulated AC and the β_2 AR-regulated MAPK bound in three distinct docking modes that corresponded to their activity profiles. ICI1118551 and propranolol, which are inverse agonists for the AC but partial agonists for the MAPK, adopted binding modes similar to that

of carazolol. These compounds position their aromatic groups in a crevice formed by TM3, 5 and 6 where they make contacts with Phe290 of TM6 and Val117 of TM3 while their secondary amino and hydroxyl groups interact with Asp113 of TM3 and their hydroxyls with Asn312 of TM7 (Fig. 4b). Bucindolol and carvedilol, which have agonistic activity for MAPK but are neutral antagonists for AC, show generally similar positioning for their secondary amino and hydroxyl groups. Also the cyanophenyl and carbazole groups of bucindolol and carvedilol respectively occupy the same crevice as the aromatic groups of ICI118551 and propranolol. However, due to their larger structures, carvedilol extends its methoxyphenyl group further and deeper towards TM2 and 7 and makes closer contacts with Ile309 and Tyr316 of TM7, whereas bucindolol folds back its indole group along TM7 toward ECL2 allowing contact of the indole with Tyr308 of TM7 and the backbone of Phe193 of ECL2 (Fig. 4c). Thus, bucindolol and carvedilol have more extensive contacts with TM7 than ICI118551 and propranolol. Metoprolol, bisoprolol and atenolol, which are inverse agonists for both AC and MAPK, displayed a drastically different docking mode when compared to the first two classes of ligands. These molecules had closer contact with ECL2, reduced interactions with TM3 and less intrusiveness toward TM7 (Fig. 4d). This may simply reflect the fact that the rigid crystal structure obtained in the presence of carazolol cannot accommodate these ligands and that significant rearrangements of the binding pocket would be required. In any case, the distinct docking signatures obtained for ligands with different activity profiles toward adenylyl cyclase and MAPK allows predictions about signalling properties. For example, carazolol and alprenolol, which are both inverse agonists towards β_2 AR-stimulated AC, would be predicted, based on their docking signature, to be partial agonists for MAPK. The close contact sites between the various ligands and the β_2 AR residues are summarized in table 1.

The docking of ligands into the rigid structure of a receptor crystal obtained in the presence of a defined ligand does not allow making inference about the distinct conformational changes that could be promoted by different ligands and that may be involved in the different efficacy profiles. The details of the binding modes for the various ligands could also be affected by such conformational changes. Despite these obvious limitations, the information obtained can be used to formulate hypotheses connecting the features of the ligand receptor interactions with the different activity profiles. Here are a few examples. As

indicated above, the position of ICL2 that allows the interaction of Tyr141 with Arg131 could result in the inverse agonist activity of carazolol, alprenolol, ICI118551 and propranolol on the AC despite the opening of the “ionic lock” (Fig. 3). This hypothesis would predict that mutations of Tyr141 could transform these compounds into partial agonists for AC. The virtual docking also suggests a potential role of the extended interaction of bucindolol and carvedilol with TM7 in their action as neutral antagonists rather than inverse agonists towards AC (Fig. 4c). Stabilizing residues in TM7 could confer agonistic properties toward Gs that may counter the inverse agonist properties propagated by the other part of the molecules in TM3 and TM6. Consistent with this idea, mutations leading to uncoupling of the β_2 AR from Gs cluster on TM7 supporting a positive role of this TM in the activation of AC⁴. Assessing whether these mutations could reveal an inverse agonist activity of bucindolol and carvedilol toward AC would directly test this hypothesis. Although the docking mode of metoprolol, bisoprolol and atenolol (Fig. 4d) are the most uncertain due to their greater difference with carazolol, it is tempting to speculate that the closer and more extensive interactions of these molecules with ECL2 may be responsible for their inverse agonist activity toward both AC and MAPK. Indeed, because ECL2 is link to the top of TM3 via a disulfide bond, stabilization of ECL2 through ligand binding may prevent all changes from being propagated to the bottom of TM3. Mutations of ECL2 residues such as Thr195, which selectively interacts with this group of compounds, should allow testing this hypothesis.

Perspectives

There is no doubt that a flurry of studies will now be aimed at testing the above and other hypotheses using the information provided by the crystal structures. However, solving additional structures of the β_2 AR and of other GPCRs bound to ligands displaying different signalling efficacies will be needed to provide a definitive description of the molecular events leading from the binding of diverse ligands to the regulation of specific signalling events. Linking unique binding modes to distinct receptor conformations and specific signalling activities has obvious implications for drug discovery. In particular, it opens the possibility of designing compounds that could selectively target distinct signalling activities thus offering the potential for the development of drugs with greater therapeutic selectivity. For this

purpose, studies aimed at better understanding the connection between specific signalling modes and complex physiological or therapeutic responses will also be required. Also, the static images provided by X-ray diffraction studies will need to be combined with more dynamic images obtained from biophysical studies probing the conformational rearrangements promoted by ligand binding. Clearly, the road toward a full understanding of the molecular determinants of GPCR signalling efficacy and the development of functionally selective ligands based on our knowledge of receptor structures is only starting. Solving the structure of the first diffusible ligand-bound GPCR represented a brilliant landmark that paves the way toward this objective.

Acknowledgement

The authors are grateful to C. Le Gouill and A. Marinier for usefull discussions, to the Canadian Institute for Health Research Team in GPCR Allosteric Regulation (CTiGAR), the Direction Générale des Technologies de l'Information et des Communications (DGTIC) of the Université de Montréal and the NMR platform of Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) for providing access to their servers for simulation and docking.

Reference List

1. Benovic, J. L., Shorr, R. G. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. The mammalian β_2 -adrenergic receptor: Purification and characterization. *Biochemistry* **23**, 4510-4518 (1984).
2. Rasmussen, S. G. *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-387 (2007).
3. Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265 (2007).
4. Rosenbaum, D. M. *et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**, 1266-1273 (2007).

5. Salom, D. *et al.* Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 16123-16128 (2006).
6. Palczewski, K. *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745 (2000).
7. Bockaert, J., Fagni, L., Dumuis, A. & Marin, P. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol. Ther.* **103**, 203-221 (2004).
8. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. β -Arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* **248**, 1547-1550 (1990).
9. Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.* **375**, 503-515 (2003).
10. Shenoy, S. K. *et al.* beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **281**, 1261-1273 (2006).
11. Daaka, Y., Luttrell, D. K. & Lefkowitz, R. J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91 (1997).
12. Azzi, M. *et al.* Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 11406-11411 (2003).
13. Galandrin, S., Oligny-Longpre, G. & Bouvier, M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 423-430 (2007).
14. Ghanouni, P. *et al.* Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 24433-24436 (2001).
15. Swaminath, G. *et al.* Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J. Biol. Chem.* **280**, 22165-22171 (2005).

16. Gales, C. *et al.* Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 778-786 (2006).
17. Roth, C. B., Hanson, M. A. & Stevens, R. C. Stabilization of the human beta2-adrenergic receptor TM4-TM3-TM5 helix interface by mutagenesis of Glu122(3.41), a critical residue in GPCR structure. *J. Mol. Biol.* **376**, 1305-1319 (2008).
18. Serrano-Vega, M. J., Magnani, F., Shibata, Y. & Tate, C. G. Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 877-882 (2008).
19. Costa T, Ogino Y, Munson PJ, Onaran HO & Rodbard D. Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol Pharmacol.* **41**, 549-560 (1992)
20. Samama P, Cotecchia S, Costa T & Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* **268**, 4625-4636 (1993).
21. Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M. & Bouvier, M. Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **45**, 490-499 (1994).
22. Samama, P., Pei, G., Costa, T., Cotecchia, S. & Lefkowitz, R. J. Negative antagonists promote an inactive conformation of the β 2- adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* **45**, 390-394 (1994).
23. Bond, R. A. & Ijzerman, A. P. Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 92-96 (2006).
24. Milligan, G. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1271-1276 (2003).
25. Rovati, G. E., Capra, V. & Neubig, R. R. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol. Pharmacol.* **71**, 959-964 (2007).

26. Watson C, Chen G, Irving P, Way J, Chen WJ & Kenakin T. The use of stimulus-biased assay systems to detect agonist-specific receptor active states: implications for the trafficking of receptor stimulus by agonists. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1230-1238 (2000).
27. Kenakin T. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci.* **16**, 232-238 (1995).
28. Baker, J. G., Hall, I. P. & Hill, S. J. Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1357-1369 (2003).
29. Galandrin, S. & Bouvier, M. Distinct Signaling Profiles of β_1 and β_2 Adrenergic Receptor Ligands towards Adenylyl Cyclase and Mitogen-Activated Protein Kinase Reveals the Pluridimensionality of Efficacy. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1575-1584 (2006).
30. Yao, X. *et al.* Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 417-422 (2006).
31. Janz, J. M. & Farrens, D. L. Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus. *J. Biol. Chem.* **279**, 29767-29773 (2004).
32. Raimondi, F., Seeber, M., Benedetti, P. G. & Fanelli, F. Mechanisms of inter- and intramolecular communication in GPCRs and G proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4310-4325 (2008).
33. Valiquette, M., Parent, S., Loisel, T. P. & Bouvier, M. Mutation of tyrosine-141 inhibits insulin-promoted tyrosine phosphorylation and increased responsiveness of the human β_2 - adrenergic receptor. *EMBO J.* **14**, 5542-5549 (1995).
34. Karoor, V. & Malbon, C. C. Insulin-like growth factor receptor-1 stimulates phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor in vivo on sites distinct from those phosphorylated in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **271**, 29347-29352 (1996).

Figure legends

Figure 1. Illustration of ligand biased signalling for the β_2 AR. Three of the signalling effectors (G_s , G_i and β arrestin) that mediate β_2 AR-promoted activation of adenylyl cyclase (AC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) are illustrated. The figure illustrates the concept that different ligands can selectively activate or inhibit different subsets of these effectors, leading to different signalling output.

Figure 2. Comparison between carazolol-bound β_2 AR and retinal-bound rhodopsin structures. a) Side by side ribbon view of β_2 AR (light blue) and rhodopsin (magenta) reveals a general similar folding of the 7 transmembranes (TM) domain and 8th helix. As expected, carazolol (red stick) and 11-*cis*-retinal (green stick) bind to analogous regions in β_2 AR and rhodopsin. b) top view of the same structures illustrating that the folds of the second extra-cellular loop (ECL2) are different for the two receptors, leading to a more open access to the binding pocket of the diffusible ligand for the β_2 AR. PyMolTM software from DeLano Scientific LLC was used to interpret the atomic coordinates from the crystal structures of β_2 AR-T4L (pdb 2rh1) and the inactive state of rhodopsin (pdb 1gzm).

Figure 3. Comparison of ICL2, “ion lock” and “toggle switch between β_2 AR and rhodopsin. Ribbon view of β_2 AR-T4L (light blue) and rhodopsin (magenta) is depicted side-by-side a) and superposed b). In a), the intra-cellular loop 2 (ICL2) of the β_2 AR, in contrast to that of rhodopsin, points towards the inside of the helical bundle. The inset of a) illustrates the 3D alpha carbon alignment of the β_2 AR-T4L ICL2 with the corresponding region in β_2 AR-Fab (yellow) highlighting the structural relationship between ICL2 and the “ion lock”. For both β_2 AR-T4L and β_2 AR-Fab, ICL2 adopts a conformation that project tyr141 towards arg131 of the TM3 “DRY” motif. In b), the relative positions of the residues involved in the “ion lock” and “toggle switch” are illustrated in stick view. Despite the excellent superposition of the “toggle switch” residues of β_2 AR with those of the inactive state of rhodopsin (b inset), the TM6 of β_2 AR is slightly more tilted, most likely as a result of the opening of the “ion lock”. The superposition of the aromatic residue cluster involved in the “toggle switch” emphasizes

that, in the β_2 AR, phe290 substitutes for the β -ionone ring of retinal in rhodopsin (**b** inset). PyMolTM was used to interpret crystal structure atomic coordinates of β_2 AR-T4L (pdb 2rh1; light blue residues), β_2 AR-Fab (pdb 2R4R; yellow residues) and rhodopsin (pdb 1gzm, magenta residues). Dark blue sticks represent nitrogen atoms and red stick represent oxygen atom. Dotted lines represent salt bridges.

Figure 4. Docking modes of β_2 AR ligands with distinct efficacies toward AC and MAPK.

a) shows that the docking mode of the virtually docked carazolol (green) overlays extensively (RMSD= 0.85Å) with the crystal bound carazolol (blue), confirming the quality of the docking. All ligands display similar binding modes inside an efficacy group but differences are observed between efficacy groups. b) shows alprenolol (magenta), carazolol (green), ICI118551 (dark blue) and propranolol (orange) c) shows bucindolol (yellow) and carvedilol (red). d) shows atenolol (grey), bisoprolol (purple) and metoprolol (brown). PyMolTM was used to interpret atomic coordinates from of β_2 AR-T4L crystal structure and β_2 AR ligands. 3D β_2 AR ligand coordinates were generated with the standardizer software from Chemaxon package. Virtual docking was carried out using the genetic algorithm from Autodock4. The predicted binding mode represented the lower binding energy from 30 independents runs of simulation per ligand.

Table 1. Contact residues on TM3, TM6, TM7 and ECL2 for each ligand. Classification of the ligands as a function of their efficacy toward AC and MAPK are from Galandrin et al.²⁹.

Compounds	Close contact residues			
	TM3	TM6	ECL2	TM7
Adenylate Cyclase inverse agonist and MAPK agonist (Fig. 5b)				
ICI118,551	asp113/val114/val117/trp109	phe289/phe290	phe193	asn312
Propranolol	asp113/val114/val117/trp109	phe289/phe290	tyr199/phe193	asn312
Carazolol	asp113/val114/val117/trp109	phe289/phe290	tyr199/phe193	asn312
Alprenolol	asp113/val114/val117/trp109	phe289/phe290	tyr199/phe193	asn312
Adenylate Cyclase neutral antagonist and MAPK agonist (Fig. 5c)				
Bucindolol	asp113/val114/val117/trp109	phe289/phe290	phe193	asn312/tyr316/tyr308
Carvedilol	asp113/val114/val117/trp109	phe289/phe290	tyr199/phe193	asn312/tyr316/Ile309
Adenylate Cyclase inverse agonist and MAPK inverse agonist (Fig. 5d)				
Metoprolol	val117	phe290	tyr199/phe193/thr195	tyr308
Bisoprolol	val114/val117	phe289/phe290	tyr199/phe193/thr195	tyr308
Atenolol	–	phe290	tyr199/phe193/thr195	tyr308

Box 1. Pharmacological definitions

Agonist: A substance that binds a receptor and triggers a response that classically mimics that of an endogenous ligand such as a hormone or a neurotransmitter. It is said to have a positive efficacy.

Inverse agonist: A substance that binds a receptor and inhibits its constitutive activity for a given response. It is said to have a negative efficacy.

Neutral antagonist: A substance that possesses no intrinsic efficacy for a given response but blocks both agonist- and inverse agonist-promoted responses.

Partial agonist or inverse agonist: Substances that have partial positive or negative efficacies. They partially promote or inhibit a response as compare to the maximal response observed with a reference compounds considered as a full agonist or inverse agonist.

Note: Classically, GPCR ligands were classified as agonists, inverse agonist or neutral antagonists based on the physiological response they evoked. In cell and cell-free assays, ligands were classified based on their ability to affect the canonical G-protein-mediated response associated to the receptor. The finding that a unique receptor can engage several distinct G protein-dependent and independent signalling cascades led to the recognition that a ligand can have different efficacies toward the various effectors and thus could be classified as agonist, inverse-agonist or neutral antagonists depending on the signalling output considered. This pluri-dimensionality of efficacy also known as functional selectivity, ligand-biased signalling or ligand texture is explained by the existence of multiple conformational states of the receptor that can activate different subsets of signalling partners.

Figure 1

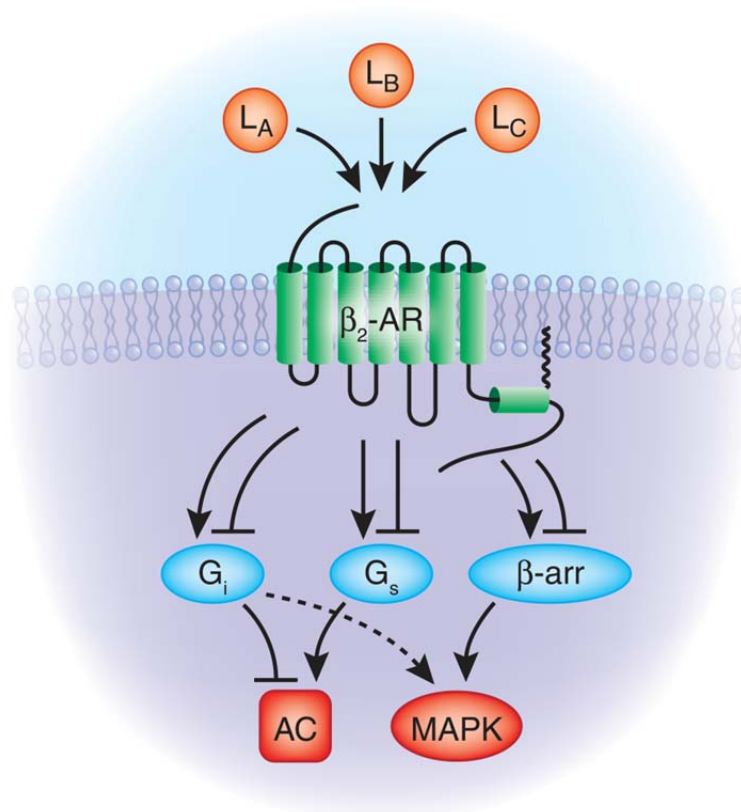


Figure 2

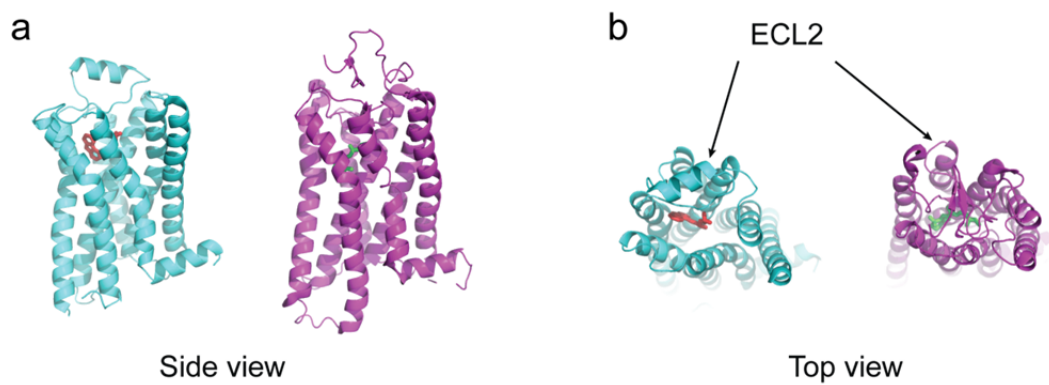


Figure 3

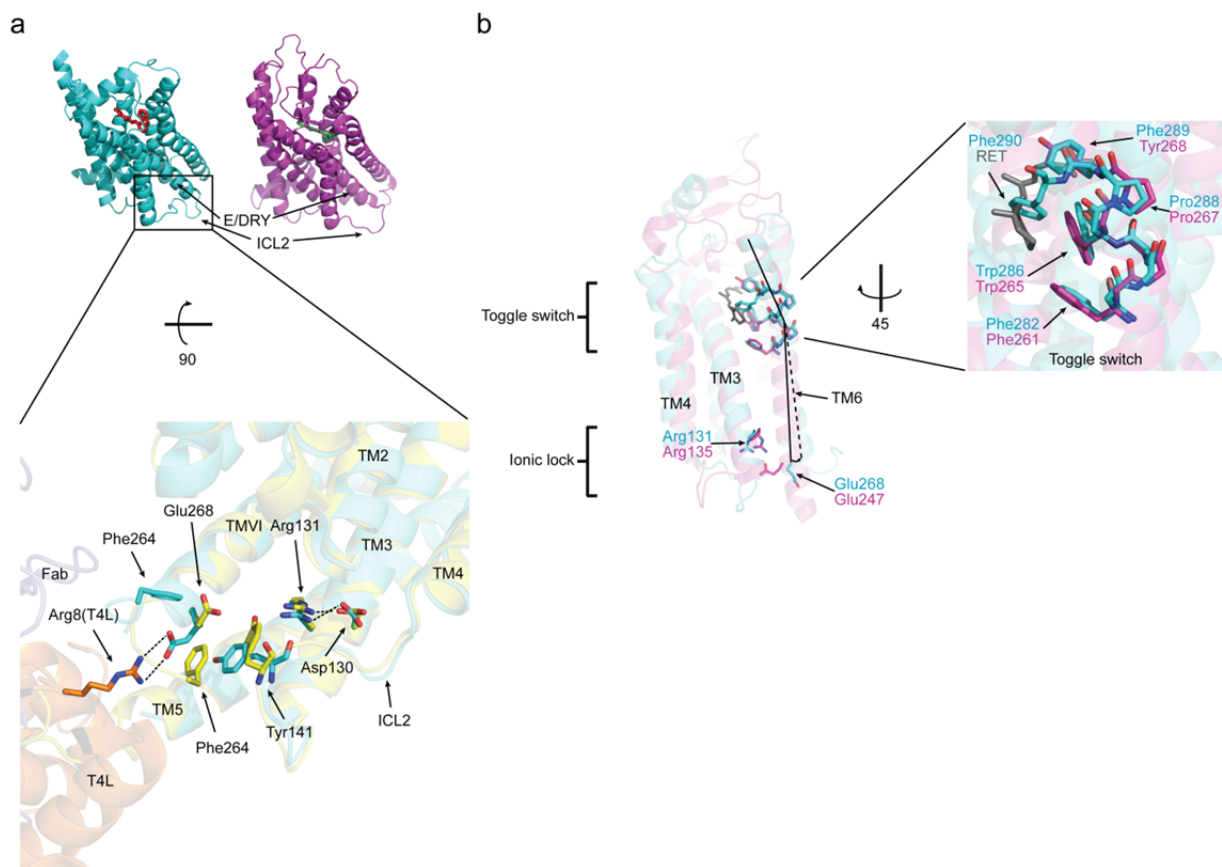
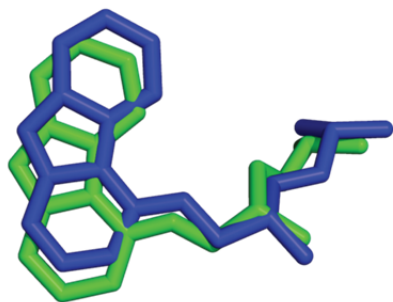
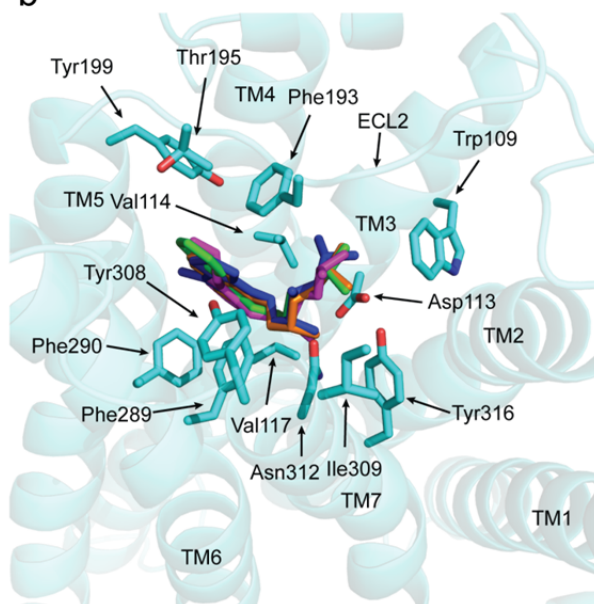


Figure 4

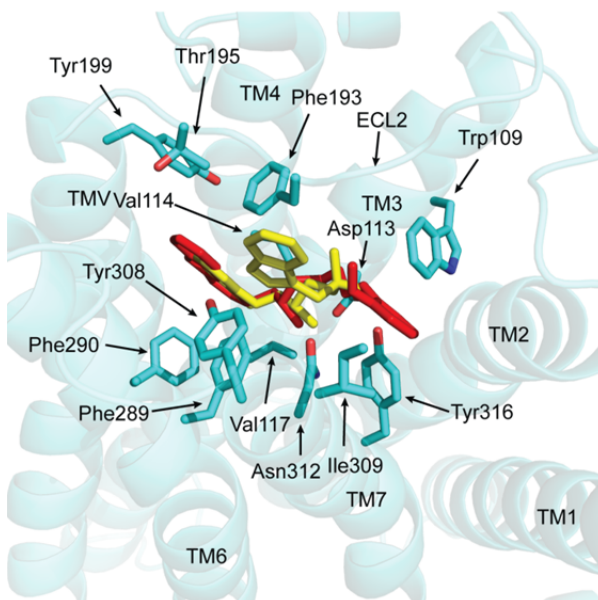
a



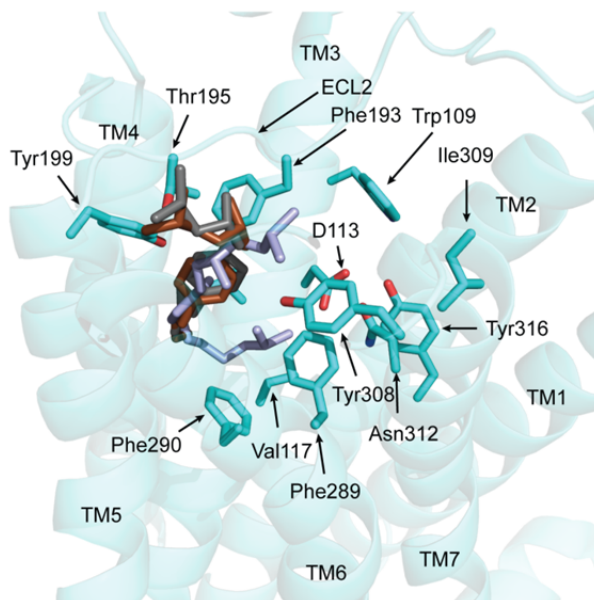
b



c



d



Article 2

Subcellular Imaging of Dynamic Protein Interactions by Bioluminescence Resonance Energy Transfer

Vincent Coulon, **Martin Audet**, Vincent Homburger, Joël Bockaert, Laurent Fagni, Michel Bouvier and Julie Perroy.

Biophysical Journal, Feb 1;94(3):1001-9, (2008)

Contexte / objectifs: L'engagement des β arrs aux RCPGs et la possibilité de localiser de manière subcellulaire les interactions impliquant les β arrs sont importants pour l'étude de la signalisation biaisée des RCPGs. Les approches expérimentales utilisant le transfert d'énergie de résonance comme le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) et le BRET permettent la détection d'un complexe protéique en temps réel sur des cellules en culture. Contrairement au BRET, le FRET a déjà été combiné avec la microscopie pour localiser de manière subcellulaire des interactions protéine-protéine. Cependant, à cause de l'excitation interne du donneur énergétique, le BRET comporte certains avantages par rapport au FRET comme l'absence d'excitation croisée de l'accepteur énergétique et le *photobleaching* des fluorophores, ce qui pourrait augmenter la précision de la mesure de l'interaction protéine-protéine. Ainsi, cet article présente la première démonstration que l'on peut mesurer la dynamique et la localisation subcellulaire de l'engagement de la β arr avec un récepteur, établissant plus généralement la preuve de principe que la combinaison du BRET et de la microscopie peut-être utilisée pour déterminer en temps réel la localisation subcellulaire d'une interaction protéine-protéine.

Contribution: J'ai commencé cette étude seul et Dre Julie Perroy s'y est jointe par la suite. Elle a ensuite terminé l'étude avec son équipe dans son nouveau laboratoire en France. Ainsi, j'ai plutôt participé aux aspects initiaux de l'étude et à la mise au point de certaines des

expériences présentées. Notamment, j'ai participé au processus de sélection de la caméra que Dre Perroy a utilisée en France pour terminer l'étude et mis au point un protocole de détection d'un signal de luminescence au microscope. De plus, j'ai participé à la mise au point de la stratégie d'utilisation de protéines de fusion pour localiser le signal de manière subcellulaire et construit beaucoup de vecteurs d'expressions utilisés. J'ai également participé à la rédaction et à la correction du manuscrit lors du processus de révision à *Biophysical Journal*.

SUBCELLULAR IMAGING OF DYNAMIC PROTEIN INTERACTIONS BY BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER

Vincent Coulon, **Martin Audet**, Vincent Homburger, Joël Bockaert, Laurent Fagni, Michel Bouvier and Julie Perroy

Keywords : BRET imaging – dynamic spatio-temporal protein-protein interactions – living cells –setting up experimental conditions -

Abstract

Despite numerous studies suggesting that proteins belong to functional networks, confirming the existence and monitoring the dynamics of such protein assemblies remain challenges. Resonance energy transfer (RET) approaches (fluorescence (FRET) or bioluminescence (BRET)) became increasingly popular to monitor protein–protein interactions in living cells. Both analyses yield useful informations using spectrophotometers, but only FRET amenable to microscopic imaging, dynamically monitoring spatio-temporal interactions. This BRET limitation relies on the low energy of bioluminescent reactions and insufficient sensitivity of cameras. This is unfortunate since BRET-imaging, because it does not depend on photoexcitation, circumvents many limitations of FRET : photobleaching, autofluorescence, donor and acceptor simultaneous excitation, phototoxicity and photobiological processes stimulation. In the present study we established conditions to image BRET. Using covalently linked renilla-luciferase and yellow fluorescent proteins, we depicted conditions permitting spatio-temporally-resolved BRET imaging in living cells. We further imaged sub-cellular dynamic interactions between the V2-vasopressin receptor and β -arrestin, providing the proof of principle that BRET can lively image specific spatio-temporal interactions.

Introduction

Protein functions rely on their ability to engage into specific protein–protein interactions and to form complexes that are dynamically regulated by stimuli. Several approaches have therefore been developed to study the occurrence and dynamic of protein–protein interactions in living subjects (1). Among them, resonance energy transfer (RET) technologies are becoming increasingly popular. This is in part due to the development of numerous fluorescent and luminescent organic molecules or proteins amenable to RET and readily usable in biological systems (2). More importantly, Fluorescence (FRET) or Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) allow to study real time interactions among proteins expressed in their correct location, in living systems (3-5). FRET and BRET are proximity based assays that rely on the non-radiative transfer of energy between donor and acceptor molecules according to the Förster mechanism. The efficacy of the energy transfer depends primarily on: (1) the overlap between the emission and excitation spectra of the donor and acceptor molecules, respectively; and (2) the close proximity and orientation of the donor and acceptor entities (6, 7). It varies inversely with the 6th power of the distance and cannot occur for distances exceeding 100Å for most RET partners currently used. This absolute distance-dependence between donor and acceptor allows to monitor protein–protein interactions by attaching RET-compatible donor and acceptor molecules to the proteins studied. In FRET, donor and acceptor are both fluorescent molecules and thus initiation of the energy transfer requires the excitation of the donor fluorophore by an external light. For BRET, the energy donor is a bioluminescent molecule that emits energy upon addition of an organic substrate. One significant advantage of BRET over FRET resides precisely in that difference that no external light excitation is required to initiate BRET. Consequently, BRET circumvents cell autofluorescence, direct excitation of the acceptor fluorophore by external excitation light, or donor fluorophore photobleaching. This results in a higher signal to background ratio and facilitates analysis of the signals generated making BRET a technology of choice for measurements using microplate readers (8).

Despite the excellent signal/noise ratio provided by BRET, the low level of light emission intrinsic to the bioluminescent luciferase reaction and the lack of sensitivity of the cameras classically used for microscopy studies have hampered the use of BRET for the

localization of protein complexes at the sub-cellular level (9). Until now, FRET was the only RET approach allowing to dynamically study the subcellular distribution of protein complexes. Unfortunately, the limitations of FRET also apply to microscopy studies. In particular, the acceptor fluorophore is directly excited and there is bleed-through of the donor fluorescence into the acceptor detection channel, making it difficult to precisely quantify the FRET efficiency especially when the local stoichiometry of the donor and acceptor are not known and their relative contribution to background signals difficult to assess (10-12). In addition, the use of an external light source may complicate certain type of experiments as a result of photo-toxicity or the undesirable activation of photo-sensitive biological processes (13). Because BRET instead of FRET could circumvent many of these difficulties the development of BRET-based microscopy would thus offer complementary approaches increasing our ability to study the spatio-temporal dynamics of protein interactions in living cells.

To make the most of the excellent signal/noise ratio provided by BRET, we established the experimental conditions to detect the low level of light emission intrinsic to the bioluminescent luciferase reaction to localize protein complexes at the sub-cellular level using microscopy technologies. Therefore both constitutive and stimuli-promoted BRET signals were detected and specially resolved in specific sub-cellular domains. In addition to providing a proof of principle that BRET imaging is possible in mammalian cells, our study details the various experimental parameters and the controls that need to be taken into account to successfully perform informative BRET Imaging experiments.

Material and Methods

Plasmids – The pDsRed-N1 plasmid was obtained from clontech. The fusion plasmids phRluc-EYFP and phRluc-EGFP2 were generated as previously described (14). In these constructs, the Rluc is fused to the fluorescent protein variant with a 26 amino acid linker (GDLASSREFSRVCRISGARSVLKLGA). The phRluc-EYFP-NLS plasmid was obtained by introducing a sequence coding for a Nuclear Localization Signal PKKKRKV (15) within phRluc-EYFP between the ApaI and BamHI restriction sites, in frame with the C-terminus coding sequence of Rluc-EYFP. The construction of pcDNA3.1-Rluc- β -arr2 and pRK5-

V2RYFP were previously described (16). The R393E and R395E mutations were inserted using PCR sitedirected mutagenesis to obtain the Rluc- β -arr2(R393E, R395E) construct.

HEK293 cell culture and transfection - HEK293 cells culture and transfection were previously described (17). For experiments using the fusion constructs, distinct pools of cells were transfected with phRluc-EYFP alone, or phRluc-EGFP2 and pDsRed-N1 (transfection reporter). Twenty-four hours after transfection, the two populations of transfected cells were pooled and cultured for an additional 24 h in glass bottom culture dishes (P35GC-0-14-C, MatTek Corporation).

BRET measurements in cell population using a spectrophotometric plate reader - Cell population BRET measurements were previously described (16). BRET imaging – BRET imaging studies were performed using a dedicated inverted fluorescence microscope Axiovert200M (Zeiss) in which all luminescent diodes were taken off and the light source was deviated with an optical fiber of 1.5 m long to limit light interferences. The microscope was installed into a black box, impermeable to environmental light pollution. All images were obtained with a Plan-Apochromat 63X/1.40 Oil M27 objective at room temperature. First, transfected cells were identified using a monochromatic light and appropriated filters to excite YFP or GFP (exciter HQ480/40 #44001– emitter HQ525/50 #42017, Chroma) and DsRed (exciter HQ540/40 #59313 – emitter HQ600/50 #65886, Chroma). Light source was then switched off until the end of the experiment. CoelH (20 μ M) was applied 10 min before acquisition, except when indicated otherwise. Images were collected using a cascade 512B camera from Photometrics (equipped with an EMCCD detector, back-illuminated, On-chip Multiplication Gain), mounted on the base port of the microscope. Sequential acquisitions of 30 sec (except when specified otherwise in the text) were performed at 5 MHz – Gain 3950, binning 1, with emission filters D480/60nm (#61274, Chroma) and HQ535/50nm (#63944, Chroma) to select em480 and em535 wavelengths respectively. The acquisition software was Metamorph (Universal Imaging). The BRET ratio images were obtained by dividing the relative intensities for each pixels of images obtained at 535 nm over 480 nm. The absolute BRET ratios were comprised between 0 and 1.5. These absolute BRET ratio values were translated on a 256 pseudo-color scale. The color of the BRET images represent the

ratiometric BRET signal, displaying 4 ratios with 64 intensity each (ranging from 0 to 256 : 0-64 indigo, 64-128 blue, 128-188 green, 188-256 yellow), corresponding to absolute BRET values ranging from a minimal ratio of 0 and a maximal ratio and 1.5. The absolute BRET value (between 0 and 1.5) are therefore expressed in a ratiometric BRET signal with a multiplying factor of $(256/1.5 = 170.66)$. For example, an absolute BRET of 1 give a ratiometric BRET signal of 170.66 represented in green. The intensity of the signal in the pseudo-color BRET image is given by the intensity of the acceptor channel emission. To determine the average intensity of em480, em535 or BRET signals, we calculated the mean intensity for each images of pixels within a square region drawn on the cell of interest (Image J). The signal to noise ratio correspond to the previous average intensity signal over the mean noise signal recorded in an adjacent equal surface without cells. To obtain the background BRET constant, resulting from an overflow of the energy donor output into the energy acceptor detection channel, we calculated the mean of pixels intensity into a square region drawn on cells expressing Rluc-GFP2 (91 + 5), or on cells transfected with Rluc- β -arr and V2R-YFP in absence of agonist (92 + 8). The Net BRET images were obtained by subtraction of the constant background signal from the total BRET signal. To follow Rluc- β -arr recruitment to the stimulated V2R-YFP receptor (fig. 5m-n), CoelH 20 μ M was applied 10 minutes before the first image acquisition whereas AVP 1 μ M was added immediately after the first acquisition. We performed ten sequential acquisitions of 30 sec in each channel every 2 minutes for 20 minutes of agonist stimulation.

Statistical analysis - The distribution of median BRET signals for each cell was analyzed using Kaleidagraph software. Statistical analyses on BRET distribution (medians and quartiles) were performed with the non-parametric Kruskal & Wallis test for more than two independent samples with a risk threshold of 5%.

Results

Validation of the BRET technology to image protein-protein interactions.

In BRET, the catalytic oxidation of Coelenterazine H (CoelH) by the bioluminescent enzyme, Renilla luciferase (Rluc) results in the emission of light with a peak at 480 nm. When

an appropriate energy acceptor such as the yellow fluorescent protein (YFP) is present within resonance energy transfer permissive distances of Rluc, part of the energy can be transferred nonradiatively leading to the excitation of the YFP and emission of light at its characteristic wavelength with a peak at 530 nm (18). In a first attempt to detect BRET signals by microscopy, we took advantage of an artificial protein directly linking Rluc to YFP through an amino acid linker of 26 amino acids. This chimeric protein generates large BRET signals that were detected using spectrometric plate readers (fig. 1) and was thus used as a positive model. One of the major difficulties in establishing RET imaging is to distinguish the signal originating from the transfer of energy from that resulting from an overflow of the energy donor output into the energy acceptor detection channel. To control for this background signal, we used another chimeric protein linking Rluc to a distinct green fluorescent protein (GFP) variant, the GFP2, which displays a maximum excitation peak at 400 nm (19), but cannot be efficiently excited at 480 nm (wavelength corresponding to Rluc peak emission). As shown in figure 1, the signal detected in cells expressing Rluc-GFP2 upon CoelH addition was not different from that observed in cells expressing Rluc alone, indicating that it corresponded to the overflow donor emission. Thus, this Rluc-GFP2 fusion, almost identical to Rluc-YFP, but unable of any energy transfer in presence of CoelH, was a stringent negative BRET control in the following BRET imaging experiments. Rluc-GFP2 was co-transfected with the DsRed used as a transfection reporter to identify null BRET cells. An other pool of cell was transfected in parallele with Rluc-YFP to obtain the positive BRET cells. Those two populations of transfected cells were subsequently mixed (24 h after transfection). Thanks to the DsRed, cells expressing Rluc-YFP or Rluc-GFP2+DsRed could therefore be identified when studied in the same microscopic field (Fig.2a-b), allowing a direct comparison of positive versus null BRET cells. The emission of light at 450-510nm (corresponding to Rluc emission peak at 480nm; em480) and 510-560nm (corresponding to the YFP emission peak at 535nm, em535) were acquired sequentially every 30 seconds, 10 minutes following the addition of CoelH (figure 2c-d). The ratio of images obtained at 535 nm over 480 nm (see methods) revealed strong signals in cells expressing Rluc-YFP whereas only marginal signals (background noise) were observed in cells expressing the BRETnull control Rluc-GFP2 (Fig. 2e-f), indicating that BRET originating from Rluc-YFP was detected at the single cell level.

Kinetic of the BRET signal.

To determine the optimal acquisition time after addition of CoelH, we recorded the em480 and em535 every minutes for 1 hour with repeated sequential acquisitions of 30 seconds at each wavelength. The em480 signal could be detected as early as 5 min after the addition of CoelH, reached its maximum between 15 and 20 min after the addition of the Rluc substrate and gradually declined afterward (fig. 2g). Since the intensity of the em480 depends on the expression level of the Rluc protein, cells displayed various intensities of em480 (fig. 2h). The em535 displayed similar kinetics and was also dependent on the expression level of the fusion proteins. As expected, however, similar levels of em480 (compare cell #3 and #4) yielded much higher em535 in cells expressing Rluc-YFP than Rluc-GFP2 at all times examined (Fig. 2i). Accordingly, the BRET ratios were greater in cells expressing the positive BRET constructs, reaching their maximum 5 min after addition of CoelH and remaining constant for at least 25 minutes thereafter (Fig. 2j). Most importantly, the maximal BRET ratios did not depend on the protein expression level and were identical independently of the em480 intensity detected (compare cells #1, #2 and #3). BRET values started to decline for acquisition obtained more than 30 minutes after CoelH addition. The decrease was more pronounced in cells expressing lower protein levels, most likely reflecting linear detection limits of the em535 that was reached with these low levels of em480 emission. Statistical analyses confirmed significantly higher BRET ratios in cells expressing Rluc-YFP (Fig. 2k), allowing a clear distinction with the population of cells expressing Rluc-GFP2. Interestingly the BRET background noise obtained in cells transfected with the negative BRET control, Rluc-GFP2, was also independent of the expression level of the fusion (Fig. 2k). Within the detection linearity range, the BRET background noise attributable to the overflow of the energy donor output in the energy acceptor detection channel could therefore be assimilated to a constant value (for a given set of detection parameters) and subtracted from the total BRET signal to obtain a net BRET image (Fig. 2f and methods).

Temporal resolution of BRET imaging.

We next assessed the minimal acquisition time necessary to detect reliable BRET signals. Cells expressing Rluc-YFP or Rluc-GFP2 (Fig. 3a-b) were therefore incubated with CoelH for 10 min before sequential acquisition of em480 and em535 for intervals of 1 to 120 sec (Fig. 3d-e). As expected, the em480 and em535 signals increased linearly with the acquisition time (Fig 3fg). However, for very short acquisition times (<10 sec) the BRET ratios were out of the linear range, probably because of the camera detection limit. Subtraction of the background BRET signal (Rluc-GFP2 cell #4) from the BRET signal displayed by the Rluc-YFP cell #2 proved the stability of the Net BRET signal for acquisition ranging from 5 to 120 seconds (fig. 3g, last panel) without saturation of the signals. Signal to noise ratios were then obtained for em480, em535 and BRET images (see methods). As shown in Fig 3h, the signal to noise ratio, which reflects the image contrast, varied as an hyperbolic function of the acquisition time. For the BRET ratios the values reached the asymptote for acquisition time above 20 sec indicating that longer acquisition time are not necessary and would not provide clearer images.

Spatial resolution of BRET imaging.

To determine if BRET imaging could offer the necessary resolution to distinguish between sub-cellular compartments, a nucleus localization signal (NLS) was attached to Rluc-YFP (Rluc-YFP-NLS). Cells transfected with Rluc-YFP-NLS displayed a BRET signal strictly restricted to the nucleus (figure 4a-f), indicating that BRET can readily be imaged in a cellular organelle. Analysis of the median and intensity distribution of BRET signals detected in individual cells revealed equivalent BRET ratios for this nuclear construct (Fig. 4g) as those observed for Rluc-YFP without nuclear localization signal (Fig. 2k). This indicated that the nuclear localization did not influence the BRET signal that remained independent of the expression level. Interestingly, upon co-transfection of Rluc-YFP-NLS with Rluc-GFP2, the specific nuclear BRET signal could readily be distinguished from the background signal originating from Rluc-GFP2 uniformly distributed in the cytoplasm and the nucleus (Fig. 4h-l). BRET signal originating from a specific sub-cellular location can thus easily be distinguished from background, even if a protein attached to Rluc is distributed throughout the

cell. This obviously opens the possibility of studying the sub-cellular localization of specific interactions.

Proof of principle: Dynamic recruitment of β -arrestin to the activated vasopressin receptor quantified in space and time by BRET imaging.

In an effort to establish whether BRET imaging could be used to monitor dynamic interactions between cellular proteins we monitored the interaction between the V2R vasopressin receptor (V2R) and β -arrestin2 (β -arr), a versatile regulatory protein that is actively recruited to many G protein-coupled receptors (GPCR) only as a result of receptor activation (20). To image V2R- β -arr interactions by BRET, we transfected cells with V2R-YFP and Rluc- β -arr fusion proteins. As expected, in the absence of receptor activation, Rluc- β -arr was homogeneously distributed throughout the cells, as illustrated by the dispersed em480 signal observed following CoelH addition. Given the lack of basal interaction between V2R-YFP and Rluc- β -arr, the weak BRET signal observed under this control condition most likely reflects the background noise resulting from the overflow of the Rluc output into the YFP acceptor detection channel (Fig 5ac). Consistent with this deduction, analysis of the mean BRET intensities in more than 10 individual cells yielded values identical (mean BRET 92 ± 8) to the background noise ratios obtained for Rluc-GFP2 (mean BRET of 91 ± 5). This constant BRET background noise could therefore be subtracted from the total BRET signal to obtain the Net BRET images (Fig 5d). In contrast, agonist stimulation of the receptor promoted strong clustering of both em480 and em535, resulting in significant BRET ratio images that reflect β -arr recruitment to the receptor (Fig 5e-h). The punctuate BRET pattern observed most likely resulted from the trafficking of the V2R/ β -arr complex to clathrin-coated pits and endocytic vesicles that can be observed throughout the cells (20). To further test the spatial resolution of BRET imaging we took advantage of a Rluc- β -arr mutant in which the C-terminal residues R393 and R395, involved in its interaction with the endocytic adaptor protein 2 AP2 are mutated to glutamic acids. The resulting β -arr(R393E,R395E) can still be recruited to the receptor but remains in a more diffuse pattern at the plasma membrane and is found only rarely in clathrin-coated pits (21, 22). As shown in figure 5m-p, the BRET images

obtained following agonist-promoted recruitment of Rluc- β -arr(R393E,R395E) could be readily distinguished from those obtained with Rluc β -arr (Fig 5e-h) in that the signal was largely restricted to the plasma membrane in agreements with the subcellular-distribution properties of this mutant form of β -arr.

BRET imaging was then used to monitor the kinetics of Rluc- β -arr recruitment to the activated V2R-YFP. Em480 and em535 were measured in the same cells before and at intervals of 2 minutes following the addition of the V2R agonist, AVP. As shown in figure 5q, the agonist promoted a time-dependent increase in the BRET signal that gradually converged into punctuate structures. The stacked histogram representation of the BRET intensities detected throughout the plane of the cell clearly indicate that the BRET signal reached its maximum after 8 min of stimulation and remained relatively constant at least up to 16 min after AVP addition (Fig. 5r), consistent with the known kinetics of β -arr recruitment to V2R (23). This kinetics of Rluc- β -arr recruitment to the V2R-YFP measured in a single cell was very similar to that determined by measuring BRET in a cell population using a lumino-fluorometer plate reader (Mithras) (Fig 5s). As shown in figure 5t, single cell microscopic BRET imaging also allowed to generate doseresponse curves of the agonist promoted Rluc- β -arr recruitment to V2R-YFP yielding an EC₅₀ for AVP identical to that obtained in cell populations using a plate reader.

Discussion

The present study provides a proof of principle that BRET can be used to image subcellular protein-protein interaction dynamics, in single living cells. We first established the experimental conditions to obtain meaningful BRET images and subsequently depicted the spatio-temporal interaction between the V2R and β -arr in mammalian cells. Coupling a sensitive EMCCD camera to a fluorescence microscope isolated from ambient light pollution is sufficient to detect em480 and em535 signals to obtain BRET images. The time windows allowing constant BRET values were sufficient to quantitatively monitor biological events in real time within the tens of seconds to tens of minutes time frame. Acquisition time between 10 and 120 sec and images obtained 5 to 30 min after CoelH addition yielded quantitatively accurate values. Obviously, these parameters will need to be established carefully for each

detection system used to perform BRET imaging. In that respect, it should be noted that the system used here relied on the sequential acquisition of the em480 and em535 signal images.

An important aspect of the BRET imaging method described herein is the ability to easily distinguish the true energy transfer signal from the background noise. The linearity of the background noise over a wide range of energy donor (Rluc) expression levels and for different proteins allow to subtract the background so to obtain the signal originating exclusively from the energy transfer generating net BRET images. We also found that for a given donor/acceptor ratio, the BRET values derived from the images are independent of the energy donor expression levels, confirming that as it is the case for FRET, BRET imaging offers the quantitative advantage of a ratiometric measurement that is independent of the absolute intensity of the energy donor. Given that it is easier to determine the background noise from BRET than FRET and that in contrary to FRET there is no artefactual direct excitation of the energy acceptor, it is easier to take advantage of the independence of RET from the expression level of the energy donor to perform quantitative BRET image analysis.

BRET imaging offers sufficient resolution to detect signals that originate selectively from sub-cellular compartments (nucleus, plasma membrane or endocytic vesicles). Indeed, the BRET signal from the nucleus-targeted Rluc-YFP-NLS fusion could easily be distinguished from the Rluc-GFP2-background signal dispersed throughout the cell. BRET imaging thus allow to detect interactions between proteins exclusively in the compartment where they occur even if the protein attached to the energy donor is widely distributed throughout the cell. This was confirmed while the BRET signal, originating from the interaction between Rluc- β -arr and V2R-YFP at the plasma membrane and endocytic vesicles, was distinguished from the background signal of the Rluc- β -arr dispersed in the cytoplasm. Finally, BRET clearly images the dynamic recruitment of β -arr to the V2R upon agonist stimulation of the receptor. Highly sensitive, the assay allowed to quantitatively monitor the kinetic and dose dependence of the recruitment at the single cell level yielding half times and EC50 similar to those obtained from the analysis in cell population (plate readers).

The possibility to image BRET signals will undoubtedly increase the breadth of potential applications of the technique. Indeed, identifying the subcellular location of the interaction monitored and quantitatively assessing changes that occur only in specific

compartments provides clear advantage over the classical spectro-photometric BRET analysis obtained from plate readers. Given the limitations of FRET imaging linked to higher and more difficult to control backgrounds, possible photo-toxic effects of prolonged light illuminations or undesirable activation of photo-sensitive biological processes, we foresee that BRET imaging will offer an advantageous method that will nicely complement the toolset currently available to study protein-protein interactions in living cells.

References

1. Piehler, J. 2005. New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. *Curr Opin Struct Biol* 15, 4-14
2. Giepmans, B. N., S. R. Adams, M. H. Ellisman, and R. Y. Tsien. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312, 217-224
3. Eidne, K. A., K. M. Kroeger, and A. C. Hanyaloglu. 2002. Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol Metab* 13, 415-421
4. Hebert, T. E., C. Gales, and R. V. Rebois. 2006. Detecting and imaging protein-protein interactions during G protein-mediated signal transduction in vivo and in situ by using fluorescence-based techniques. *Cell Biochem Biophys* 45, 85-109
5. Lippincott-Schwartz, J., and G. H. Patterson. 2003. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300, 87-91
6. Tsien, R. Y., B. J. Bacskaï, and S. R. Adams. 1993. FRET for studying intracellular signalling. *Trends Cell Biol* 3, 242-245
7. Wu, P., and L. Brand. 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal Biochem* 218, 1-13
8. Boute, N., R. Jockers, and T. Issad. 2002. The use of resonance energy transfer in highthroughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* 23, 351-354
9. Ayoub, M. A., C. Couturier, E. Lucas-Meunier, S. Angers, P. Fossier, M. Bouvier, and R. Jockers. 2002. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277, 21522-21528

10. Erickson, M. G., B. A. Alseikhan, B. Z. Peterson, and D. T. Yue. 2001. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca^{2+} channels revealed by FRET in single living cells. *Neuron* 31, 973-985
11. Gordon, G. W., G. Berry, X. H. Liang, B. Levine, and B. Herman. 1998. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 74, 2702-2713
12. Wallrabe, H., and A. Periasamy. 2005. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol* 16, 19-27
13. Nagoshi, E., C. Saini, C. Bauer, T. Laroche, F. Naef, and U. Schibler. 2004. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119, 693-705
14. Hamdan, F. F., M. Audet, P. Garneau, J. Pelletier, and M. Bouvier. 2005. Highthroughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* 10, 463-475
15. Kalderon, D., B. L. Roberts, W. D. Richardson, and A. E. Smith. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509
16. Perroy, J., S. Pontier, P. G. Charest, M. Aubry, and M. Bouvier. 2004. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat Methods* 1, 203-208
17. Perroy, J., L. Adam, R. Qanbar, S. Chenier, and M. Bouvier. 2003. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *Embo J* 22, 3816-3824
18. Pflieger, K. D., and K. A. Eidne. 2006. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 3, 165-174
19. Mercier, J. F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit, and M. Bouvier. 2002. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277, 44925-44931
20. Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, L. S. Barak, and M. G. Caron. 1999. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274, 32248-32257

21. Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, and M. G. Caron. 2000. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275, 23120-23126
22. Vrecl, M., R. Jorgensen, A. Pogacnik, and A. Heding. 2004. Development of a BRET2 screening assay using beta-arrestin 2 mutants. *J Biomol Screen* 9, 322-333
23. Charest, P. G., and M. Bouvier. 2003. Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 278, 41541-41551
24. Xu, X., M. Soutto, Q. Xie, S. Servick, C. Subramanian, A. G. von Arnim, and C. H. Johnson. 2007. Imaging protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in plant and mammalian cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10264-10269

Notes

We thank A. Carette, M. Vasseur, M. Hogue, C. Grolleau for technical help, F. Raynaud for critical analyses of the images and D. Rochdi and D. Michaud for providing Rluc-barr2(R393E,R395E). This work was supported by the European Community (LSHM-CT-2004-511995, SYNSCAFF), CNRS, INSERM, ANR, Région Languedoc Roussillon and CIHR. MB holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. During the submission process of this manuscript, a related article has been published (24).

Figure Legends

Figure 1. RLuc-GFP2 fusion as a stringent negative control to determine the background BRET signal. Cells transfected with the soluble Rluc or Rluc-YFP fusion or Rluc-GFP2 construct were incubated in the presence of CoelH 10 minutes before measurement of em480 and em535 in a spectrophotometric plate reader (a) or under microscope (b). Data are means + SEM of three independent experiments (Mithras) or means + SEM of 10 or 15 cells for each transfection condition (BRET imaging). Note that in both experiments the BRET signal obtained in cells transfected with the Rluc-GFP2 construct is not significantly different from the one obtained in cells expressing the soluble Rluc, thus validating the use of Rluc-GFP2

construct as a stringent negative control to measure the background BRET signal (ie signal obtained in absence of BRET acceptor).

Figure 2. Em480, em535 and BRET images. a-b: YFP fluorescence (a) comparison with DsRed fluorescence (b) was used to discriminate between cells expressing RLuc-YFP (cells 1, 2 and 3), RLucGFP2/DsRed (cell 4) or DsRed alone (cell 5). c-d: Sequential acquisition (30 sec each) of em480 (c) and em535 (d) recorded 10 min following the addition of 20 μ M CoelH. e: BRET ratio images (derived from d/c) presented in pseudocolors. f: Net BRET ratio images (presented in pseudocolors) obtained by subtracting mean BRET background noise value of 91 (calculated on ten independent cells expressing the RLucGFP2 construct) to the BRET ratio image presented in e. g: Images of em480 acquired every 5 min from 0 to 60 min after CoelH application. h-j: intensities of em480 (h), em535 (i) and BRET (j) signals over one hour after CoelH application. k: boxes illustrating the median and dispersion of the maximal BRET ratio intensities (10 minutes after addition of CoelH) for independent cells expressing Luc-YFP (9 cells) or Luc-GFP2 + DsRed (6 cells) or DsRed (2 cells). Each value was obtained by determining the BRET ratio for each pixel within a square of 21 X 21 pixels in the middle of the cell. The axes bar indicates the em480 level (indicative of the fusion protein amount) of each independent cells analyzed.

Figure 3. Influence of acquisition time for BRET imaging. a-b: YFP fluorescence (a) comparison with DsRed fluorescence (b) was used to discriminate between cells expressing RLuc-YFP (cells 1, 2 and 3), RLucGFP2/DsRed (cells 4 and 5) or DsRed alone (cell 6). c: BRET ratio images derived from 10 sec sequential acquisition of em480 and em535 10 min following the addition of CoelH. d-e: em480 (d) and em535 (e) images obtained for acquisition time varying from 1 to 120 sec recorded 10 min following the addition of CoelH. f – Em480 (upper panel) or em535 (lower panel) intensities recorded for the indicated acquisition time along a cross-section of cell #1 (see white bar; 1 pixel = 250 nm). g-h: Average of em480, em535, BRET and Net BRET signal intensities (g) and signal to noise ratios (h) measured for each pixel in the white and blue squares of 21 X 21 pixels of cells #2 and #4 respectively (drawn in a) as a function of acquisition time. The Net BRET values

resulted from the subtraction of the BRET ratios in cell #4 from the BRET ratios in cell #2 (blue and black points of the brut BRET curves, respectively).

Figure 4. Nuclear BRET imaging. a, and b: YFP fluorescence (a) versus DsRed fluorescence (b) in cells expressing RLuc-YFP-NLS (cells 1 and 2; note the nuclear labeling), RLucGFP2/DsRed (cell 3; note the labeling throughout the cell). c, d: Sequential acquisition (30 sec each) of em480 (c) and em535 (d) 10 min following the addition of CoelH. e: BRET ratio images (derived from d/c) presented as pseudo-colors. f: BRET average intensities for a cross-section of cell #1 expressing RLuc-YFP-NLS (see white bar in image e; 1 pixel = 250 nm). g: Boxes illustrating the median and the distribution of the BRET ratio intensities for independent cells expressing Luc-YFP-NLS (9 cells) or Luc-GFP2 + DsRed (2 cells). Each value was obtained from a square of 14 X 14 pixels in the nucleus region of the cell. The axes bar indicates the em480 level (indicative of the fusion protein amount) of each independent cells analyzed. h-k: Cells were co-transfected with RLuc-YFP-NLS and RLucGFP2 and fluorescence measured to identify the expressing cells (h). Em480 (i), em535 (j), and BRET images (k) obtained as above. l – BRET average intensities for a cross-section of cell #3 and 4 (see white bar in image k, and blue bar in image e ; 1 pixel = 250 nm). m – Illustration of the median and distribution of BRET ratio intensities measured from squares of 14 X 14 pixels in the nucleus (yellow squares) or cytoplasm (blue squares) of 4 independent cells co-transfected with RLuc-YFP-NLS and RLuc-GFP2.

Figure 5. BRET imaging of β -arr recruitment to activated V2R. Cells were co-transfected with V2RYFP and Rluc- β -arr (a-h and q-t), or V2R-YFP and Rluc- β -arr (R393E,R395E) (i-p). a-p: Em480, em535, BRET and Net BRET images obtained under basal conditions (a-d and i-l) or following stimulation with 1 μ M AVP for 15 min (e-h and m-p). Right panels of figures c, g, k and o represent a zoom of the indicated square regions. q: em480, em535 and BRET images measured in the same cell as a function of time following addition of AVP. r: Normalized stacked histogram of the pseudo-color BRET values determined in a plane of 21 pixels by 21 pixels for each time of AVP stimulation in a single cell. s: Kinetics of Rluc- β -arr recruitment to the stimulated V2R-YFP measured by BRET on a population of cells using a fluoro-luminometer plate reader. t: Dose-response curves of AVP-stimulated Rluc- β -arr

recruitment to V2R-YFP determined on a single cell (BRET imaging) or on a cell population (plate reader). Agonist effects were measured 15 min following AVP stimulation. Data represent means + SEM of 3 independent experiments (plate reader) or means + SEM of 5 to 6 cells for each AVP concentration (BRET imaging).

Figure 1

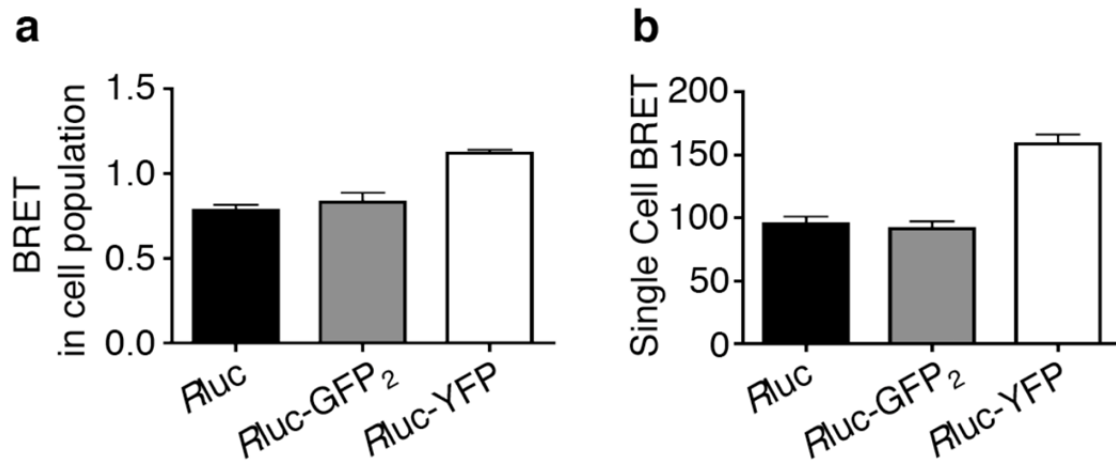


Figure 2

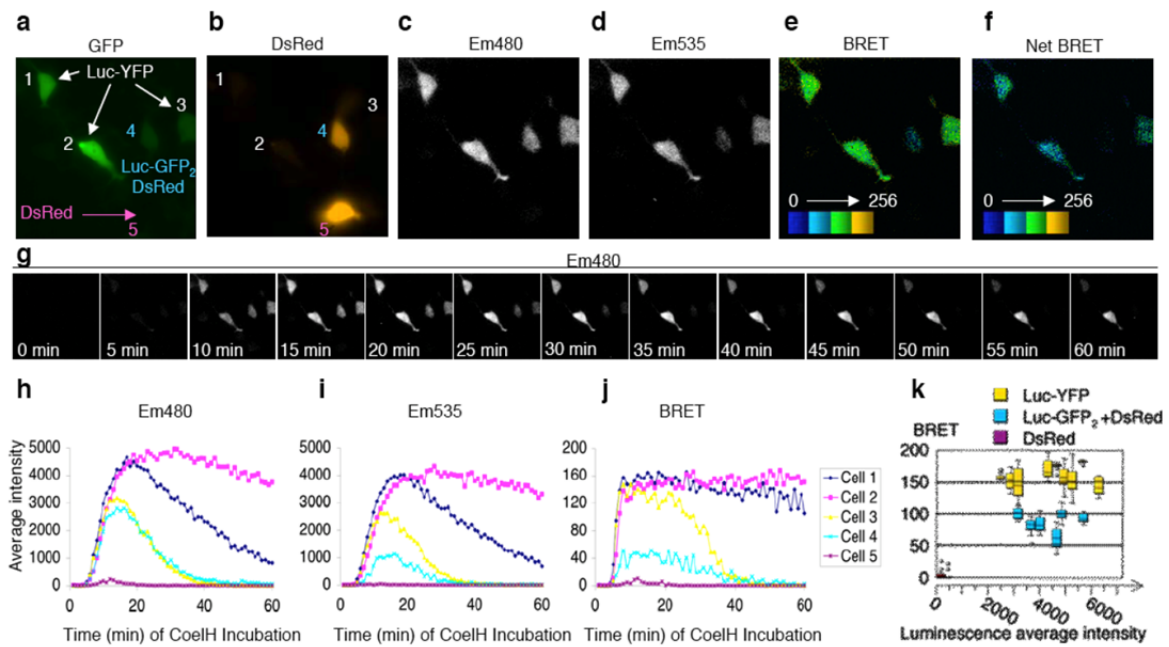


Figure 3

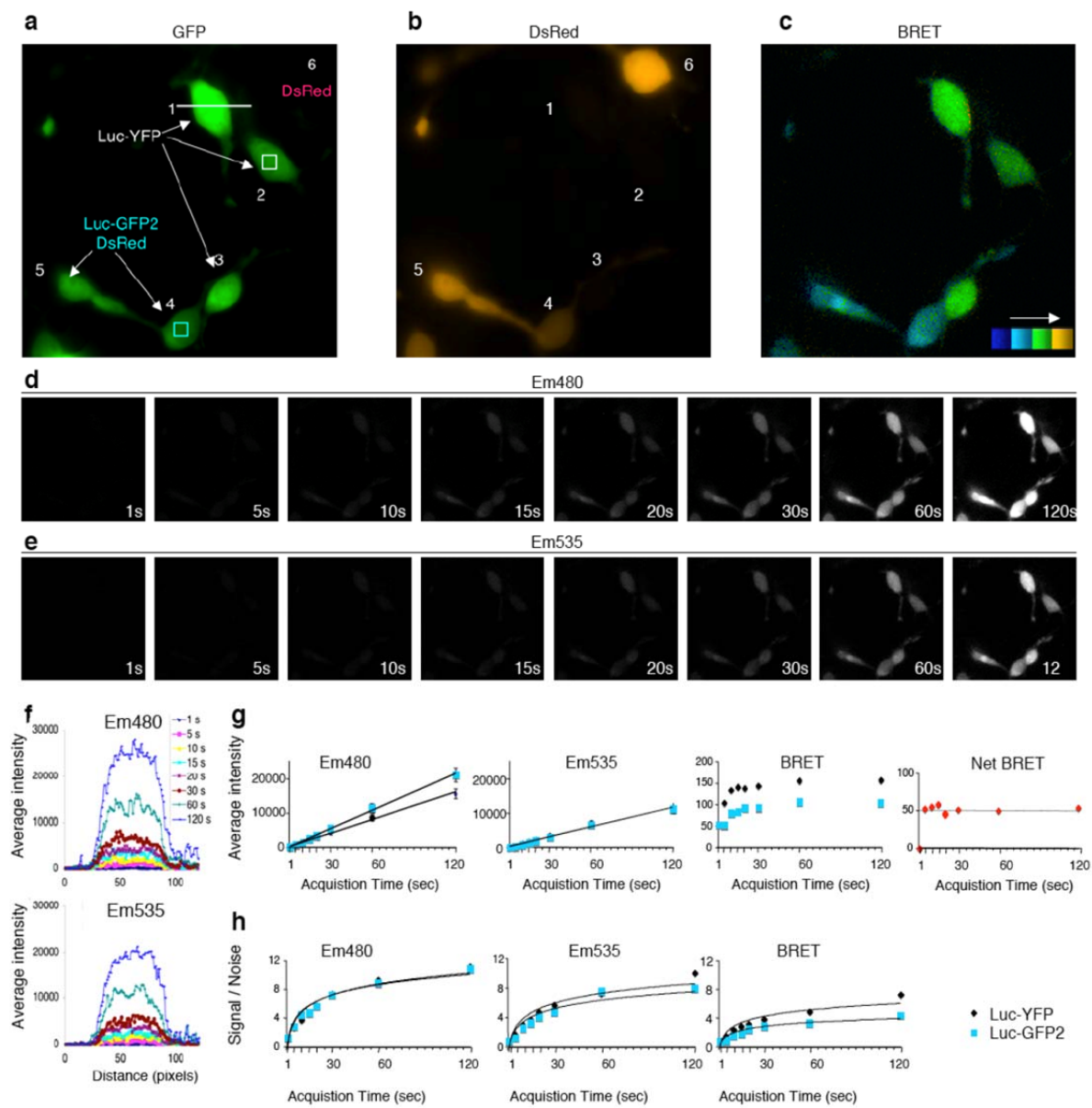


Figure 4

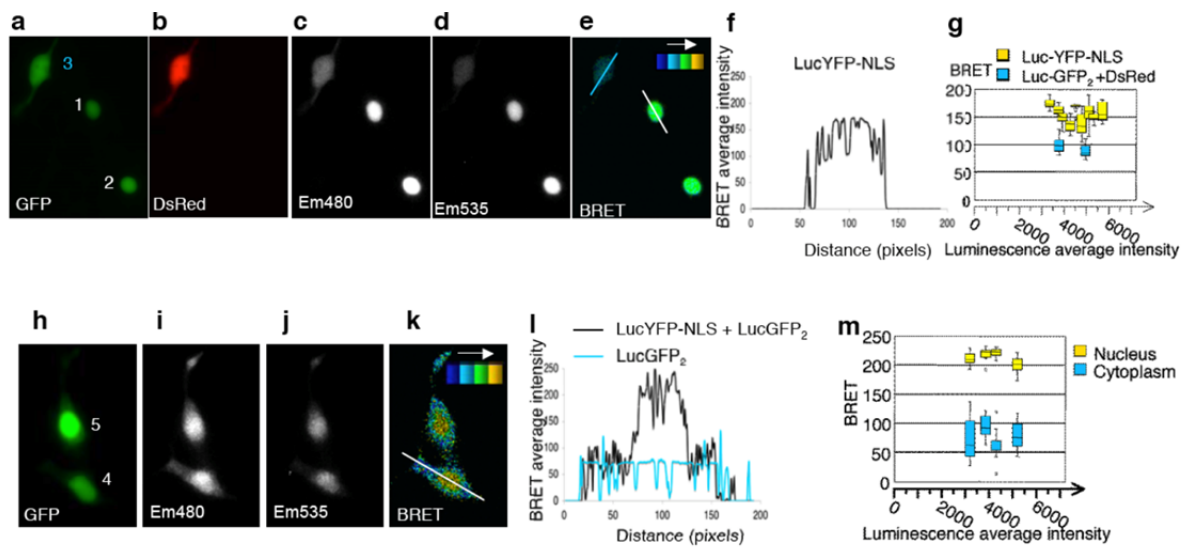
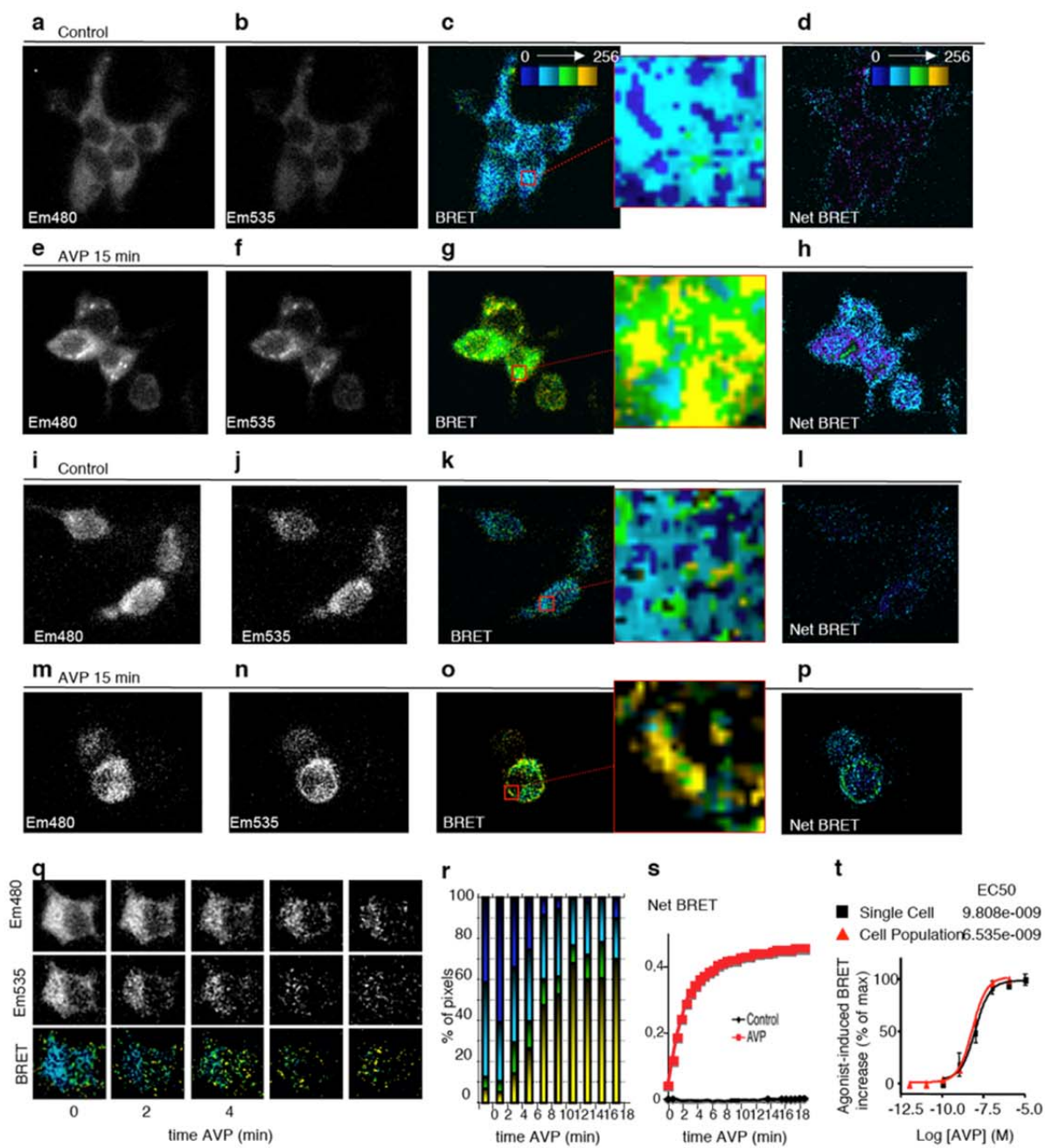


Figure 5



Article 3

Protein-Protein Interactions Monitored in Cells from Transgenic Mice Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer

Martin Audet, Monique Lagacé, David W. Silversides, and Michel Bouvier

FASEB Journal, Aug;24(8):2829-38, (2010)

Contexte / objectifs: L'étude de l'engagement des β arrs aux RCPGs dans un contexte natif est importante pour déterminer les rôles de la signalisation biaisée dans les systèmes physiologiques. Cependant, la plupart des méthodes utilisées dans ces systèmes dépendent souvent d'une manipulation biochimique de l'échantillon dans des conditions qui dénaturent le contexte original de l'interaction. De nouvelles approches utilisant le phénomène de transfert d'énergie de résonance comme le BRET ont été développées permettant de suivre notamment l'engagement des β arrs aux récepteurs en temps réel dans des modèles cellulaires en culture. De plus, la biocompatibilité du substrat coelenterazine et des partenaires luminescents *RLuc* / *GFP* suggèrent que le BRET pourrait être détecté dans des organismes complexes comme les mammifères. En accord avec ces propriétés, des études récentes ont démontré qu'il était possible de détecter le signal BRET provenant d'une souris vivante dans laquelle des cellules exprimant des partenaires BRET ont été implantées. L'objectif de cette étude est de passer à l'étape suivante et de détecter l'engagement des β arrs aux RCPGs dans des cellules ou tissus natifs provenant de souris transgéniques exprimant les partenaires de BRET. Les résultats ont permis de démontrer qu'on pouvait détecter l'engagement de la β arr2 au β 2AR dans des cellules fraîchement extraites de ces souris transgéniques, offrant ainsi la preuve de principe de la viabilité de cette approche qui pourrait être étendue à l'ensemble des interactions protéines-protéines.

Contributions: Dans cette étude, j'ai conçu et réalisé toutes les expériences, incluant le génotypage des souris et la planification de la reproduction. De plus, j'ai rédigé le manuscrit sous la supervision de mon directeur de thèse.

Protein-Protein Interactions Monitored in Cells from Transgenic Mice Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer

Martin Audet, Monique Lagacé, David W. Silversides, and Michel Bouvier,

Short Title: BRET in transgenic mouse cells

Abstract

Monitoring the dynamics of protein-protein interactions in their natural environment remains a challenge. Resonance energy transfer approaches represent a promising avenue to directly probe these interactions in real time. The present study aims at establishing a proof of principle that bioluminescence resonance energy transfer (BRET) can be used to study the regulation of protein-protein interaction in cells from transgenic animals. A transgenic mouse line co-expressing the β_2 -adrenergic receptor fused to *Renilla* luciferase (β_2 AR-*Rluc*) and β arrestin-2 fused to a green fluorescent protein (GFP2- β arr2) was generated. The fusion proteins were found to be functional in the transgenic animals and the β_2 AR-*Rluc* maintained pharmacological properties, comparable to that of the native receptor. Sufficiently high luminescence signal was generated to allow detection of BRET in testis cells where the β_2 AR-*Rluc* transgene was expressed at levels significantly higher than that of the endogenous receptor in this tissue but remain within physiological range when compared with other β_2 AR expressing tissues. Stimulation with a β -adrenergic agonist led to a significant dose- and time-dependent increase in BRET, which reflected ligand-promoted recruitment of β arr2 to the receptor. Our study demonstrates that BRET can be used to monitor the dynamic regulation of protein-protein interactions in cells derived from transgenic mice.

Key words: beta-arrestin2, beta2-adrenergic receptor, *Renilla* luciferase, green fluorescent protein

Introduction

In recent years, a large variety of assays were designed to allow the identification and monitoring of protein-protein interactions. However, most of these assays rely on *in vitro* or heterologous expression systems in cultured cells. Yet, the ability to identify interacting partners and to monitor their interaction dynamics in native environments will be essential to build a realistic view of the molecular events underlying many physiological and pathophysiological processes. Proximity assays based on resonance energy transfer (RET) offer an avenue to monitor protein-protein interaction in the living organism. RET is a phenomenon occurring between two or more chromophores close to each other when the emission spectrum of one (the donor) overlaps with the excitation spectrum of the other (the acceptor). Following donor excitation, part of the electronic relaxation energy of the donor molecule is transferred to the acceptor molecule as a function of the distance between the donor and the acceptor, and the relative orientation of their dipole moments. RET can be determined by monitoring the light emission from the acceptor upon donor excitation. The strict dependence of RET on the inter-chromophoric distance (RET efficacy being inversely proportional to the 6th power of the distance between the energy donor and acceptor) makes it an assay of choice to monitor protein complexes. This is particularly true when considering that the average radius of a protein is ~50Å and that the maximal distance allowing RET for most chromophores is ~100Å. The occurrence of RET between chromophores attached to two proteins can therefore be taken as a result of the interaction of these two proteins within a macro-molecular complex.

Intra-molecular fluorescence resonance energy transfer (FRET) has already been used in living animals to monitor the conformational rearrangements of biosensors designed to detect changes in second messengers or kinase activities. For this purpose, transgenic animals (mice (1-6), fruitfly (7), and zebrafish (8)) expressing uni-molecular protein sensors fused to FRET-pairs were generated and the intra-molecular FRET signals recorded by fluorescence microscopy imaging in tissues derived from these animals. To our knowledge, however, FRET in transgenic animal tissues has not, as yet, been used to monitor protein-protein interactions in a bi-molecular FRET configuration.

A different form of RET that relies on a bioluminescent enzyme (generally *Renilla* luciferase, *Rluc*) as the energy donor has also been used to monitor conformational rearrangements and protein-protein interactions (9;10). Since the transfer of energy is initiated by the addition of the bioluminescent enzyme substrate (generally coelenterazine), one of the main advantages of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) over FRET is the complete absence of background emission coming from non-specific cells excitation by an external light beam, as is the case in FRET where both donor and acceptor are photo-excitable chromophores. In recent years, BRET has become increasingly popular to monitor different types of protein-protein interactions and their dynamic regulation in cultured cells, with a special emphasis on G protein-coupled receptor (GPCR) signalling regulation (11-18). A few studies aimed at adapting BRET to the detection of protein-protein interaction in animals. In one such study, HEK293T cells expressing FKBP-*Rluc* and a green fluorescent protein (GFP) fused to FRB (GFP2-FRB) as BRET partners were injected subcutaneously in mice and the BRET generated by the rapamycin-promoted interaction between FKBP and FRB monitored in the entire animal by imaging (19). Using a similar imaging approach, another study showed that quantum dots can be used as BRET acceptors and visualized in mice injected with C6 glioma cells labeled with quantum dots chemically fused to *Rluc* (20). Although useful steps toward the establishment of a proof of principle that BRET can be monitored in the tissues of living animals, these studies used engineered systems that relied on exogenous cells injected in the animals. Thus, the present study was initiated to determine whether protein-protein interactions could be monitored by BRET in cells from animals transgenically expressing energy donor and acceptor fused to proteins of interest. For this purpose, we used the well characterized interaction between the β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR), and the regulatory protein β arrestin (β arr) that had previously been detected by BRET in cultured cell systems (11;21;22).

The β_2 AR is a member of the GPCR family that is characterized by seven transmembrane domains and transduces signals from a vast diversity of hormones and neurotransmitters. In addition to promote the activation of heterotrimeric G proteins, stimulated GPCR rapidly become phosphorylated by G protein-coupled receptor kinase (GRK), an event that triggers the translocation of β arr to the receptor, causing its uncoupling

from the G protein and its endocytosis (23). Thus we used this dynamic recruitment event to propose a proof of principle that BRET can be used to monitor real-time protein-protein interactions in a native transgenic mouse environment.

To do so, heterozygous transgenic mouse lines expressing the β_2 AR fused to *Rluc* (β_2 AR-*Rluc*) and β arr2 fused to GFP2 (GFP2- β arr2) were generated and crossed to generate transgenic animals expressing the two transgenes. The ability of a β_2 -adrenergic agonist to promote β arr recruitment to the β_2 AR was tested in tissues from these mice.

Materials and Methods

Material- Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, glutamine and phosphate buffer saline (PBS) were from Wisent, Inc. Cell culture plates and dishes were from Corning. Nitrocellulose membranes were from Whatman (Dassel, Germany). Hybond-N+ southern blot membranes were from GE Healthcare (Baie d'Urfe, Canada). ULTRAhyb hybridization buffer were from Ambion (Austin, TX). The Bio-Rad D_c Protein Assay kit and the 10DG desalting column were from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Canada), while the nickel-NTA beads were from IBA (Göttingen, Germany). [³H]cAMP, [³²P]ATP, [³²P]CTP and [¹²⁵I] were from PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA). SuperSignal West Dura Luminol for western blot detection was from Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL). (-)-isoproterenol, alprenolol, bovine serum albumin (BSA), soybean trypsin inhibitor, leupeptin, benzamidine, PMSF, 1,10-phenanthroline and lysozyme were from Sigma (St-Louis, MO). Polyethylenimine (PEI) was from Polysciences, Inc (Warrington, PA). Collagenase type IV was from Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ). All DNA restriction enzymes are from New England Biolab (Ipswich, MA). DeepBlueCTM coelenterazine was purchased from Perkin-Elmer (Wellesley, MA). Coelenterazine h was purchased from Prolume (Pinetop, AZ). The rabbit anti-βarr2 antibody (C16D9) was from Cell Signalling Technology (Danvers, MA) and the horseradish peroxidase (HRP) conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (NA934V) was from GE Healthcare (Baie-D'Urfe, Canada). The Optimal Cutting Temperature embedding medium (OCT) was from Sakura Tissue Tek (Torrance, CA).

Vectors- The vectors used for transgenic mice were generated as follow: a previously described 0.8kb DNA fragment located 5' to the associated transcripts' exon 1 of the ROSA26 gene promoter (24;25) was PCR amplified, inserted into the cloning pGemT vector (Promega) between *AgeI/SalI* and subcloned into the modified pEGFP-1 plasmid using *PstI* and *SacII* restriction sites. The eGFP gene was then removed from the modified pEGFP-1 vector using *SacII/XbaI*. For the GFP2-βarr2 fusion protein transgenic expression vector, a DNA adaptor encoding a *NheI* restriction site was inserted in the *SacII/XbaI* site of the modified pEGFP-1. The fusion GFP2-βarr2 sequence was PCR amplified and inserted between *NheI/XbaI* in the

modified pEGFP-1. For the β_2 AR-hRluc fusion protein transgenic expression vector, the β_2 AR-hRluc sequence was PCR amplified and inserted between *SacII/XbaI* in the modified pEGFP-1 vector. The amino acid sequence of the linker between GFP2- β arr2 and β_2 AR-hRluc is GSGTGS. Finally, these vectors were linearized using *EcoRI/SspI* prior to microinjection. The His-tagged GFP2 vector (pQE80GFP2) for GFP2 bacterial expression and purification was constructed as follows: the DNA sequence of the last 29 amino acid residues (343-371) of the soluble c-tail region of the Arginine Vassopressin Receptor 2 (V2R) as well as the GFP2 DNA sequence were PCR amplified and then fused by overlapping PCR. The DNA fusion product was inserted between *BamHI/HindIII* in pQE80 vector from Qiagen (Mississauga, Canada). The amino acid sequence of the linker between the C-tail of V2R and GFP2 is GGKGDGN.

Animals- Transgenic mice were generated via conventional pronuclear microinjection using embryos derived from FVB/N inbred mice (26). For each of the lines created, a tyrosinase minigene was co-injected to provide a visible marker for transgenesis, thus reducing the need for genetic validation during routine expansion and maintenance of the mouse lines (27). For pigmented lines generated, the integration of the β_2 AR-Rluc or GFP2- β arr2 transgenes were confirmed by polymerase chain reaction (PCR), and lines displaying co-integration (β_2 AR-Rluc transgene and tyrosinase minigene, GFP2- β arr2 transgene and tyrosinase minigene) were selected for further biological studies. All animal manipulations were carried out in accordance with institutional guidelines and were approved by a local ethics committee.

Southern blot and integrated copy number determination- The number of integrated copies of the transgenes in the β_2 AR-1 and the β arr2-1 lines was determined by southern blot analysis. Genomic DNA from tail of mouse was isolated with the E.Z.N.A tissue DNA kit from OMEGA Bio-Tek (Norcross, GA). DNA were digested with *NheI* restriction enzyme, separated by agarose gel electrophoresis and then transferred to a Hybond-N+ membrane. Membranes were then hybridized in ULTRAhyb hybridization buffer with [32 P]dCTP labelled probes targeting the Rluc or the GFP2 sequences of the β_2 AR-Rluc and GFP2- β arr2 transgenes in the β_2 AR-1 and β arr2-1 lines, respectively. Signals were collected on a phosphorimager screen using a FLA-5000 detection device from Fujifilm (Mississauga, Canada). The

integrated copy number of each of the transgene was determined by comparing the hybridization signal of the transgenes with a standard curve consisting of increasing amounts of *NheI* linearized p β Gluc-GFP2 plasmid (22), as previously described www.phenogenomics.ca/transgenics/protocols_forms.html. Densitometric analysis of the bands was performed using Multi Gauge software from Fujifilm (Mississauga, Canada).

Transfection and cell culture- HEK293T cells were cultured in DMEM supplemented with 5% FBS, 2mM glutamine, 0.1 unit/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were transfected using a PEI transfection procedure. Briefly, 1 ml of DMEM was mixed with 30 μ g of PEI and 10 μ g of DNA, vortexed and added to HEK293 cells plated onto 100 mm petri dishes. The transfected cells were then cultured for an additional 48 hours before further experimental procedures.

Testis cells dispersion- Freshly excised testis were decapsulated on ice and dispersed by doing three rounds of 37°C incubation in 0.5 mg/ml collagenase type IV alternated by three rounds of washing with PBS. Supernatants from these dispersion steps were pooled and the cells pelleted by centrifugation at 300 x g for 10 min. Cells were then resuspended in 900 μ l of PBS, counted and resuspended to a final concentration of 10 million cells per ml.

BRET assay- 1 million of freshly dispersed testis cells were distributed per well of 96-wells white Optiplate microplates from PerkinElmer (Wellesley, MA). Following the indicated pharmacological treatment, 10 μ M of DeepBlueCTM coelenterazine was added to the cells and the signals were collected using a modified TopCount-NXT reader from Packard Instrument Compagny (Meriden, CT) that is able to sequentially integrate light signals detected in the 370-450 nm and 500-530 nm windows using appropriate filters. The BRET is determined as the ratio of the signal detected in the 500-530 nm band pass divided by the signal detected in the 370-450 nm band pass multiply by 1000 and expressed as mBRET units.

Fluorescence Measurement- The total fluorescence signal was detected in a 96 wells plate fluorescence reader FluoroCountTM from Packard Instrument Compagny (Meriden, CT) with excitation and emission filters set at 400 nm and 510 nm, respectively. Measurements were

done using 250,000 testis cells for screening the single transgenic (primary) mouse lines and using 100 µg of soluble protein preparation for screening the expression in the various tissues of the β_2 AR-1/ β arr2-1 double transgenic mice.

Luciferase Activity- Luminescence signal were detected as followed: Coelenterazine h was added to a final concentration of 5 µM and readings were collected using luminescence plate reader FUSION™ from Packard Instrument Compagny (Meriden, CT) without any emission filter. Measurements were done using 1 million testis cells for screening single transgenic (primary) mouse lines and using 100 µg of membrane protein preparation for screening the expression in the various tissues of the β_2 AR-1/ β arr2-1 double transgenic mice. To transform the luminescence signal detected into molar quantities of β_2 AR-Rluc, luminescence measurements and radio-ligand binding using [125 I]-cyanopindolol ([125 I]CYP) were performed in the same testis membrane preparation derived from the β_2 AR-1/ β arr2-1 transgenic line. The net number of β_2 AR-Rluc sites was obtained by subtracting the number of receptor detected in the wild type (WT) mouse testis membrane fraction and the luminescence signal transformed into RLU/pmol of receptor.

Tissue section preparation- Frozen tissue sections from testes of transgenic and non-transgenic mice were generated using standard procedures. Briefly, rapidly after excision, testes were fixed overnight at room temperature in a 10% buffered formalin solution and immersed for 2 hours in a 25% sucrose aqueous solution. Testes were then snap frozen at -20°C in OCT and 5 micron thick sections obtained using a Leica Reichert-Jun Cryocut 1800 tissue cryostat from Leica microsystems (Richmond Hill, ON, Canada).

Fluorescence microscopy- All fluorescence microscopy images were generated on a Carl Zeiss Axiovert LSM510 META confocal microscope (Jena, Germany) using oil 40x objective with 1.3 numerical aperture, 405 nm diode laser, 505-530 nm bandpass emission filter, a pinhole of 158 µm and an aquisition time of 1.6 µs.

Western blot- Organs from transgenic mouse or HEK293T cells transiently expressing GFP- β arr2 were lysed with a potter in hypotonic buffer (25 mM Tris, 2 mM EDTA and protease

inhibitor pH 7.4), centrifuged at 40,000 g for 20 min at 4°C and the protein concentration in the supernatant measured. Aliquots from the supernatant were then heated in Laemmli buffer containing 50 mM dithiothreitol for 5 min at 95°C before separation of the protein on SDS-PAGE (100 µg of protein per lane for tissue extracts and 25 µg of proteins per lane for HEK293T cell extracts). GFP-βarr2 was detected by immuno-autoradiography using the rabbit anti-βarr2 specific antibody (C16D9) and HRP-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody followed by chemiluminescence reaction. Light emission was detected using a LAS-3000 CCD camera device from Fujifilm and densitometric analysis of the bands were performed using Multi Gauge software from Fujifilm.

Membrane Preparation and Radioligand Binding Assay- Tissues were excised from the mice and lysed with a potter in hypotonic buffer (25 mM Tris, 2 mM EDTA and protease inhibitor pH 7.4) and centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C to get rid of the nuclei and cell debris. Supernatants were then centrifuged at 40,000 x g for 20 min at 4°C and the pelleted membranes washed twice in the same buffer. 50 µg of membrane proteins (25 µg for lung) were then incubated with a saturating concentration (250 pM) of the β-adrenergic antagonist [¹²⁵I]CYP for 60 min at room temperature. The binding reaction was stopped by rapid filtration of the membranes on GF/C fiber glass filters separating free from bound [¹²⁵I]CYP. Nonspecific binding was defined in the presence of 10 µM alprenolol.

Adenylyl cyclase activity assay- Adenylyl cyclase activity was determined according to the method of Salomon et al. (28). Briefly, 20 µg of membrane preparation was incubated in the presence or absence of various concentrations of the β-adrenergic ligands isoproterenol and/or alprenolol or AlF₄ with 10 mM theophyllin, 1 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 50 mM NaCl, 0.5 mM ATP, 50 µM GTP, 5 mM creatine phosphate, 20 U/ml creatine phosphokinase in a total volume of 50 µl in the presence of 0.5 µCi [³²P]ATP and 0.02 µCi [³H]cAMP. Samples were incubated for 20 min at 37°C. The reaction was stopped as previously describe (29). [³²P]cAMP was separated from [³²P]ATP by sequential chromatography over Dowex and alumina resins and [³H]cAMP used to calibrate chromatography efficacy.

Statistics- Analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Dunnett or Tukey tests were used for multiple comparisons; Dunnett tests being used to compare multiple conditions to a single control whereas Tukey tests were used to identify the difference within a group. Student-t tests were performed for pairwise comparison. Nonlinear regression analyses of the dose response curves as well as the linear regression on the standard curve were done using GraphPad Prism software (La Jolla, CA). The $EC_{50} \pm SD$ and slope $\pm SD$ values were derived from the respective curves.

Results

Production and selection of the double transgenic mouse line

Heterozygous transgenic mouse lines were generated expressing either the β_2 AR fused to *Rluc* at its C-terminus or β arr2 fused to GFP2 at its N-terminus (Fig. 1A). Since the ROSA26 promoter was reported to direct moderate ubiquitous expression of transgenes in mice (24;25), we selected the 0.8kb DNA fragment located 5' to the associated transcripts' exon 1 of the ROSA26 gene promoter with the intention of driving the expression of the two BRET partners in many tissues while avoiding exaggerated over-expression.

Lines that integrated the β_2 AR (4 lines) and β arr2 (2 lines), as detected by PCR analysis of genomic DNA, were analyzed for construct expression. The expression of β_2 AR-*Rluc* and GFP2- β arr2 in each of the generated lines was determined by measuring the luminescence and the fluorescence signal, respectively, from freshly dispersed testis cells (Fig. 1B, C). β_2 AR-*Rluc* was found to be significantly expressed, albeit at different levels, in all the lines selected. The luminescence level varied by a factor of 3 between the lowest (β_2 AR-4) and the highest expressing (β_2 AR-1) lines (Fig. 1B), reflecting different receptor expression levels in the different mouse lines. The relationship between the luminescence signal obtained for β_2 AR-*Rluc* and the number of receptor sites determined by radio-ligand binding was established and indicates expression levels between 0.8 and 3 fmol/100,000 cells (Fig. 1B, right axis). Of the two GFP2- β arr2 lines, only one, β arr2-1, was found to express detectable level of GFP2- β arr2 in the testis, as shown by the significant fluorescence signal above the auto-fluorescence detected in the WT mouse cells (Fig. 1C). To transform the relative fluorescence values into molar quantities of GFP2- β arr2, we established a standard curve using purified GFP2 (Supplementary Figure 1). From that curve, the expression level of the GFP2- β arr2 in the β arr2-1 line was estimated to be approximately 0.2 pmol/100,000 cells (Fig. 1C, right axis). Despite the lack of significant detectable fluorescence in the β arr2-2 line, individuals from the two GFP2- β arr2 lines were crossed with mice from each of the β_2 AR-*Rluc* lines so as to generate eight crosses of heterozygous double transgenic animals, whose genome contained both β_2 AR-*Rluc* and GFP2- β arr2 transgenes. The expression of the two transgenic proteins was then analyzed in freshly dispersed cells from the testes of the double

transgenic animals (Fig. 2). The luminescence signals observed in these mice were equivalent to that obtained in the respective parental lines. Similarly, as was observed in the single GFP2- β arr2 mouse lines, only the double transgenic lines derived from the β arr2-1 mouse line displayed a fluorescence signal above the WT autofluorescence. Thus, the double transgenic mice retain parental line expression, confirming proper germ line transmission for both β ₂AR-*Rluc* and GFP2- β arr2. We selected the double transgenic mice yielding the highest luciferase and GFP activities, β ₂AR-1/ β arr2-1, for further characterization. Using quantitative southern blot analysis, we estimated that 1 copy of the β ₂AR-*Rluc* and 2 copies of GFP2- β arr2 transgenes were integrated per diploid genome of mice (data not shown).

Expression analysis of the transgenes

The expression levels of β ₂AR-*Rluc* and GFP2- β arr2 were assessed in extracts of kidney, testis, liver, spleen, heart, lung and brain tissues derived from the β ₂AR-1/ β arr2-1 line. As shown in Fig. 3A, significant luminescence signals above background were observed to different extents in the extract of all tissues tested. The highest luminescence level was detected in the testes (~350 fold over background) whereas the lowest was found in the kidney (~4 fold over background). Radio-ligand binding experiments carried out in membrane preparations using [¹²⁵I]CYP as the tracer confirmed the high expression level of a binding competent β ₂AR in testes (Fig. 3B). Indeed, the receptor level achieved in the testes of the transgenic animals (105 ± 13 fmol/mg) represents approximately 8 fold increase over the endogenous level (12 ± 3 fmol/mg). In all other tissues, the small increase in [¹²⁵I]CYP binding observed did not reach statistical significance. This is consistent with the low luminescence signal observed in all tissues, except the testes (Fig. 3A), and indicates that the resulting small increase in the number of receptor sites above endogenous levels fell below the radio-ligand binding assay sensitivity and/or within the error margins of the signals. Consistent with this interpretation, transforming the luminescence signal into receptor number, using the correspondence between luminescence and the [¹²⁵I]CYP binding observed in the testes, predicts increase in expression levels varying between 0.8 fmol/mg of protein for the kidney and 14.8 fmol/mg for the lung (Fig. 3A right axis).

For the GFP2- β arr2 construct, significant levels of fluorescence above the autofluorescence of the WT mice were detected only in the testes of the β_2 AR-1/ β arr2-1 line (Fig. 4A). This testis-specific expression pattern was confirmed by western blot analysis using an anti- β arr2 antibody (Fig. 4B). Indeed, the ~77kDa immunoreactive band corresponding to the molecular weight of GFP2- β arr2 was observed only in extracts of testes and HEK-293 cells transfected with a vector coding for the fusion protein. The immunoreactive band observed at 53kDa in all tissue extracts corresponds to the endogenous β arr2. Assuming that the antibody (raised against human β arr-2) recognized the mouse β arr with the same affinity, the relative intensity of the bands suggests that the GFP2- β arr2 transgene was expressed at a level ~60 fold over that of the endogenous protein in the testes. This is consistent with the expression level of 20 pmol/mg of protein estimated using purified GFP2 as a standard (Fig. 4A, right axis), when considering that endogenous β arr2 levels range from undetectable in H9c2 cells to ~0.8 pmol/mg in Jerkat cells (J. Benovic personal communication).

The expression of GFP2- β arr2 in testes was also documented by confocal fluorescence microscopy of 5 μ m cross-sections of the testes seminiferous tubules obtained from β_2 AR-1/ β arr2-1 double transgenic and WT mice. As shown in Fig. 4C, the fluorescence signal from the β_2 AR-1/ β arr2-1 mice was spread over Leydig, Sertoli and germ cells. In contrast, high autofluorescence signal from the WT mice was limited to interstitial Leydig cells, as expected (30).

Since the two transgenes were simultaneously expressed at detectable levels in testes, this tissue was chosen for subsequent characterization. First, the functionality of the β_2 AR-*Rluc* was assessed by monitoring the β_2 AR-promoted adenylyl cyclase activity in testis membrane preparations derived from either WT or β_2 AR-1/ β arr2-1 mice. As shown in Fig. 5A, the ability of the β -adrenergic agonist isoproterenol to stimulate the production of cAMP was significantly greater (3.3 fold) in the double transgenic mice whereas the ability of a direct activator of the stimulatory G protein, aluminium fluoride, was only marginally different (1.2 fold), indicating that the β_2 AR-*Rluc* fusion construct was functional and conferred increased β -adrenergic signalling efficacy. The selectivity of the activation was confirmed by the ability of alprenolol, a β -adrenergic antagonist, to block the isoproterenol-stimulated response. Also, a

dose response curve of the isoproterenol-stimulated cAMP production (Fig. 5B) revealed an EC₅₀ of 117±31 nM, which is similar to values previously reported for β_2 AR-stimulated adenylyl cyclase activity (31). The receptor transgene expressed in the testes thus preserved functional properties comparable to that of the endogenous receptor. The barely detectable isoproterenol-stimulated cAMP production observed in testis membrane preparations derived from WT mice is consistent with the very low level of endogenous β_2 AR detected in this tissue (~12 fmol/mg protein; Fig. 3B).

BRET monitoring of β arrestin recruitment to the β_2 AR

To establish that BRET can be used to study protein-protein interactions in cells derived from transgenic animals expressing the proper biosensors, we monitored the BRET signal between β_2 AR-*Rluc* and GFP2- β arr in freshly dispersed testis cells from β_2 AR-1/ β arr2-1 double transgenic mice. The BRET signal was determined as the ratio of light emitted at 515±15 nm (GFP2 channel) over that emitted at 410±40 nm (*Rluc* channel) 2 min following the addition of the *Rluc* substrate DeepBlueCTM coelenterazine. The background BRET signal (originating from the overflow of luciferase signal detected in the GFP2 emission channel) was determined by measuring BRET in testis cells derived from transgenic mice expressing only the energy donor β_2 AR-*Rluc* (β_2 AR-1). As shown in Fig. 6A, the basal BRET signal observed in the β_2 AR-1/ β arr2-1 mouse cells was not significantly different from the background BRET detected in the β_2 AR-1 derived cells, indicating that, as expected, no constitutive recruitment of GFP2- β arr2 to β_2 AR-*Rluc* was observed. However, stimulation of the receptor with isoproterenol led to a significant increase in BRET in the β_2 AR-1/ β arr2-1 mouse cells without affecting the background BRET, indicating that the agonist-promoted recruitment of β arr2 to the β_2 AR could be detected in living cells from the transgenic mice. The isoproterenol-promoted increase in BRET was completely blocked by the antagonist alprenolol, which on its own had no effect on the signal, confirming the pharmacological selectivity of the ligand-promoted BRET increase. A BRET dose response curve of the isoproterenol-stimulated β_2 AR-*Rluc*/GFP2- β arr2 mouse cells revealed an EC₅₀ of 60 ± 21 nM (Fig. 6B), similar to the value observed for the agonist-stimulated cAMP production (Fig. 5B). The BRET increase was time-dependent, reaching statistical significance as early as 60

seconds following the addition of isoproterenol and remaining stable for at least 5 minutes (Fig. 6C), thus giving a kinetic compatible with the recruitment of β arr2 to the β_2 AR as documented in heterologous expression systems (22;32-34).

Discussion

The present study constitutes the first proof of principle that BRET assays can be used to monitor protein-protein interactions in cells derived from transgenic mice. Our approach contrasts with previous studies where cells heterologously transfected with BRET biosensors were implanted in animal (19;35). Although these studies clearly demonstrated that BRET can be detected in living animals, they were not designed to monitor physiologically relevant protein-protein interactions in their normal environment, since either fusion protein directly linking the donor and the acceptor (33) or artificial dimerizing systems (18,33) were used. The present study demonstrates that regulated interactions between physiologically relevant proteins can be monitored in cells from mice transgenically expressing BRET donor and acceptor. This clearly establishes that the levels of energy donor and acceptor needed to measure BRET can be attained by transgenesis, at least in some tissues. Our study also demonstrates that fusion of GFP2 and *Rluc* to the protein of interest did not grossly affect their normal function. Indeed, the concentration-dependence to agonist stimulation and kinetics of the β_2 AR/ β arr2 interactions observed in the cells from transgenic animals were identical to those previously observed in other systems with different methods (32-34). The functionality of the β_2 AR-*Rluc* was also confirmed by the potentiated β -adrenergic-stimulated adenylyl cyclase activity observed in the testis membranes from transgenic mice.

Also of interest, agonist-promoted BRET was observed at receptor expression levels that are within the physiological range observed in various tissues. As expected, the β_2 AR expression in the testes of the transgenic mice was significantly higher than the endogenous level in this tissue. However, it only reached ~ 105 fmol/mg of protein, a receptor concentration that is lower than the endogenous levels of β AR observed in spleen (150 fmol/mg) and lung (277 fmol/mg). The expression level of the GFP2- β arr2, for its part, was significantly higher than the endogenous level detected, reaching ~ 60 fold the native levels in the testes. Whether BRET could have been detected with lower GFP2 expression levels is

uncertain. However, it should be mentioned that the selection of the positive mouse lines involved the detection of fluorescence that overcomes the auto-fluorescence signal. This may favour the selection of highly expressing lines. Since BRET measures do not rely on light excitation, lower level of GFP2 could be amenable to BRET detection. This would however require an alternative detection mode (ex: Western blot analysis) of the GFP2 to identify the positive lines.

The fact that sufficient expression of the two partners permitting BRET was reached only in the testes was unfortunate since it limited the types of tissues where β arr recruitment to the receptor could be monitored. However, the expression of the β_2 AR in the testes cannot be considered as physiologically irrelevant since low but detectable levels of endogenous β AR were measured by radio-ligand binding in WT mouse testes, reaching levels (12 ± 3 fmol/mg) that is not significantly different from what is detected in the heart (16 ± 3 fmol/mg) where β_1 and β_2 AR are known to have physiological roles (36). Consistent with a physiological role of the β_2 AR in mouse testis is the report that the positive effect of catecholamine on testosterone production is mediated, in part, by this receptor subtype (37-39).

The reason for which the transgenes had an apparent tissue-dependent distribution clearly favouring the testes, despite the previously described ubiquitous ROSA26-directed expression pattern, is unclear. However, testes were also among the tissues showing the highest expression level of a transgene in a study using the same 0.8kb ROSA26 promoter fragment, suggesting that it could be an intrinsic property of the promoter (24). Yet, this does not appear to be universal since, in some mouse lines, expression in lung, brain and kidney was higher than in the testes, indicating that the site of insertion of the transgene in the genome could also be a factor contributing to the differential tissue distribution. The expression pattern of the GFP2- β arr2 appeared even more restricted than that of the β_2 AR-Rluc (Fig. 4 vs Fig. 3). This may reflect that the expression achieved in the tissues other than the testes did not reach the levels needed for Western blot detection and were not sufficient to overcome the auto-fluorescence signal. Alternatively, subtle toxic effect of GFP has previously been suggested as a possible cause for lower expression levels of GFP-fused proteins (40). Future experiments using promoters that drive stronger ubiquitous or tissue-

specific expression will be needed to determine if BRET can be detected in tissues other than the testes.

The proof of principle that BRET can detect protein-protein interactions in cells from transgenic animals opens the possibility of monitoring the influence of both long term and short term *in vivo* manipulations (ex: drug treatment, disease evolution, etc...) on such specific protein-protein interactions. It also offers the perspective of monitoring changes in the dynamics of such interactions during animal development in a context where the cells, in which the interactions are monitored, were exposed to the normal physical and hormonal environment.

FRET could also be used to detect protein-protein interactions in living animals. However, the intrinsic autofluorescence of tissues, resulting from the required external excitation of the donor, will present a challenge that may force the expression of supra physiological concentrations of the fluorophore-fused partners to generate appropriate signal to noise ratio. This drawback is avoided in BRET experiments since the donor energy is provided by a luminescence reaction and does not involve light excitation of the tissue. Due to the absorbance properties of tissues, the excitation and detection of fluorophores in whole animals will also represent technical challenges for *in-vivo* FRET experiments. In BRET experiments, the delivery of the substrate to the luminescent donor could also be perceived as a problem. However, several studies have shown that systemic administration of coelenterazine allowed the detection of *Rluc* luminescence deep in animal tissues (41), thus suggesting that the penetration of the substrate would not represent a problem for *in-vivo* BRET experiments. The detection of the BRET signal *in situ* would nevertheless remain a challenge due to the lack of sensitivity of the current image detection systems.

Obviously, the fact that the BRET detection was performed in freshly dispersed cells does not provide the same advantages as monitoring these changes in whole animals. Yet, it provides significant advantages over heterologous expression in cultured cells since freshly dispersed cells maintain much more of their native characteristics than immortalized cells or even primary cells that can rapidly undergo phenotypic changes. Although the level of light emitted by the energy donor and acceptor in the present study do not allow the use of BRET to detect protein-protein interactions *in situ*, our study can be seen as a first step toward this goal

and represents a proof of principle, establishing that regulated real-time protein-protein interactions should be amenable to BRET analysis in living transgenic animals. The recent development of novel mutant forms of *Rluc* with improved light emission intensity (35;42) coupled to more sensitive detection system should make this goal achievable in a near future, opening the avenue to broad applications of BRET-based biosensors in transgenic mice.

Acknowledgements

The authors thank Drs. Mounia Azzi, Patricia René, Louis Gaboury and Fadi Hamdan for their assistance in the development of some of the methods as well as Marc Palardy, Céline Forget and Diana Raiwet for their roles in the vector design, construction, generating transgenic mouse lines, southern analysis and animal colony maintenance. We are also grateful to Dr Hiroyuki Kobayashi for his critical reading of the manuscript. This work was supported by grants of the Canadian Institute for Health Research to M.B. and D.W.S. (GOP-48289). M.A. held studentships from the CIHR/Canadian Hypertension Society/Pfizer joint program and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. M.B. holds the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

References

1. Ducros, M., Moreaux, L., Bradley, J., Tiret, P., Griesbeck, O., Charpak, S. (2009) Spectral unmixing: analysis of performance in the olfactory bulb in vivo. *PLoS.ONE*. 4, e4418
2. Hara, M., Bindokas, V., Lopez, J. P., Kaihara, K., Landa, L. R., Jr., Harbeck, M., Roe, M. W. (2004) Imaging endoplasmic reticulum calcium with a fluorescent biosensor in transgenic mice. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 287, C932-C938
3. Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., Miyawaki, A. (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 10554-10559

4. Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M. J., Engelhardt, S. (2006) Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ.Res.* 99, 1084-1091
5. Wier, W. G., Rizzo, M. A., Raina, H., Zacharia, J. (2008) A technique for simultaneous measurement of Ca²⁺, FRET fluorescence and force in intact mouse small arteries. *J.Physiol* 586, 2437-2443
6. Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Gagliani, M. C., de, F. T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., Lohse, M. J. (2009) Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS.Biol.* 7, e1000172
7. Lissandron, V., Rossetto, M. G., Erbguth, K., Fiala, A., Daga, A., Zaccolo, M. (2007) Transgenic fruit-flies expressing a FRET-based sensor for in vivo imaging of cAMP dynamics. *Cell Signal.* 19, 2296-2303
8. Xie, Y., Ottolia, M., John, S. A., Chen, J. N., Philipson, K. D. (2008) Conformational changes of a Ca²⁺-binding domain of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger monitored by FRET in transgenic zebrafish heart. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 295, C388-C393
9. Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B., Bouvier, M. (2006) Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr.Protoc.Neurosci.* Chapter 5, Unit
10. Pfleger, K. D., Eidne, K. A. (2006) Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat.Methods* 3, 165-174
11. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilaiet, S., Chelsky, D., Dennis, M., Bouvier, M. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 3684-3689

12. Gales, C., Rebois, R. V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T. E., Bouvier, M. (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat.Methods* 2, 177-184
13. David, M., Richer, M., Mamarbachi, A. M., Villeneuve, L. R., Dupre, D. J., Hebert, T. E. (2006) Interactions between GABA-B1 receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels. *Cell Signal.* 18, 2172-2181
14. Hasbi, A., Devost, D., Laporte, S. A., Zingg, H. H. (2004) Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2. *Mol.Endocrinol.* 18, 1277-1286
15. Charest, P. G., Terrillon, S., Bouvier, M. (2005) Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep.* 6, 334-340
16. Perroy, J., Pontier, S., Charest, P. G., Aubry, M., Bouvier, M. (2004) Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat.Methods* 1, 203-208
17. Coulon, V., Audet, M., Homburger, V., Bockaert, J., Fagni, L., Bouvier, M., Perroy, J. (2008) Subcellular imaging of dynamic protein interactions by bioluminescence resonance energy transfer. *Biophys.J.* 94, 1001-1009
18. Hamdan, F. F., Rochdi, M. D., Breton, B., Fessart, D., Michaud, D. E., Charest, P. G., Laporte, S. A., Bouvier, M. (2007) Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J.Biol.Chem.* 282, 29089-29100
19. De, A., Gambhir, S. S. (2005) Noninvasive imaging of protein-protein interactions from live cells and living subjects using bioluminescence resonance energy transfer. *FASEB J.* 19, 2017-2019
20. Xia, Z., Rao, J. (2009) Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer. *Curr.Opin.Biotechnol.*

21. Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., Pineyro, G. (2003) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 11406-11411
22. Hamdan, F. F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., Bouvier, M. (2005) High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J.Biomol.Screen.* 10, 463-475
23. Hanyaloglu, A. C., von, Z. M. (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 48, 537-568
24. Kisseberth, W. C., Brettingen, N. T., Lohse, J. K., Sandgren, E. P. (1999) Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. *Dev.Biol.* 214, 128-138
25. Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G., Soriano, P. (1997) Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 3789-3794
26. Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., Hansen, C. T., . (1991) FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 2065-2069
27. Methot, D., Reudelhuber, T. L., Silversides, D. W. (1995) Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 23, 4551-4556
28. Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal.Biochem.* 58, 541-548
29. Azzi, M., Pineyro, G., Pontier, S., Parent, S., Ansanay, H., Bouvier, M. (2001) Allosteric effects of G protein overexpression on the binding of beta-adrenergic ligands with distinct inverse efficacies. *Mol.Pharmacol.* 60, 999-1007

30. Hedger, M. P., Eddy, E. M. (1987) The heterogeneity of isolated adult rat Leydig cells separated on Percoll density gradients: an immunological, cytochemical, and functional analysis. *Endocrinology* 121, 1824-1838
31. O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Bouvier, M. (1989) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J.Biol.Chem.* 264, 7564-7569
32. Drake, M. T., Violin, J. D., Whalen, E. J., Wisler, J. W., Shenoy, S. K., Lefkowitz, R. J. (2008) beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* 283, 5669-5676
33. Naga Prasad, S. V., Laporte, S. A., Chamberlain, D., Caron, M. G., Barak, L., Rockman, H. A. (2002) Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J.Cell Biol.* 158, 563-575
34. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., Caron, M. G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J.Biol.Chem.* 274, 32248-32257
35. De, A., Ray, P., Loening, A. M., Gambhir, S. S. (2009) BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J.*
36. Triposkiadis, F., Karayannis, G., Giamouzis, G., Skoularigis, J., Louridas, G., Butler, J. (2009) The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J.Am.Coll.Cardiol.* 54, 1747-1762
37. Gunnarsson, D., Nordberg, G., Selstam, G. (2007) Differential effects of cadmium on the gene expression of seven-transmembrane-spanning receptors and GAPDH in the rat testis. *Toxicol.Lett.* 168, 51-57

38. Breuiller, M., Tahri-Joutei, A., Ferre, F., Pointis, G. (1988) Beta-adrenergic receptors and stimulatory effects of (-) isoproterenol on testosterone production in fetal mouse Leydig cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 151, 1454-1460
39. Tolszczuk, M., Follea, N., Pelletier, G. (1988) Characterization and localization of beta-adrenergic receptors in control and cryptorchidized rat testis by in vitro autoradiography. *J.Androl* 9, 172-177
40. Swenson, E. S., Price, J. G., Brazelton, T., Krause, D. S. (2007) Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker. *Stem Cells* 25, 2593-2600
41. Bhaumik, S., Gambhir, S. S. (2002) Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 377-382
42. Kocan, M., See, H. B., Seeber, R. M., Eidne, K. A., Pflieger, K. D. (2008) Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. *J.Biomol.Screen.* 13, 888-898

Figure Legends:

Figure 1. Expression levels of β_2 AR-Rluc and GFP2- β arr2 in parental heterozygous mouse lines. *A)* Schematic representation of the transgenic fusion genes β_2 AR-Rluc and GFP2- β arr2 under the control of the 0.8 kb DNA fragment of the ROSA26 promoter. *B and C)* Cells from testes of the different heterozygous lines were freshly dispersed before the experiment. *B)* Luminescence emission was used to monitor expression levels of the β_2 AR-Rluc transgene in the different mouse lines (1 million cells) and is expressed as relative luminescence units (RLU, left axis). The RLU was also correlated to the number of specific binding site as described in *Materials and Methods* and expressed as fmol/100,000 cells (right axis). *C)* Fluorescence emission was used to monitor the GFP2- β arr2 transgene in the two parental mouse lines obtained (250,000 cells) and expressed as specific relative fluorescence units (specific RFU, left axis), where the signal from WT mouse was subtracted. The specific RFU was also correlated to the amount of GFP2- β arr2 protein expression using a standard curve of purified GFP2 proteins as described in supplementary Figure 1, and reported as pmol/100,000 cells (right axis). Error bars represent the mean \pm SEM of measurements performed in at least three different experiments. * indicates $p < 0.05$ and ** indicates $p < 0.01$ for comparison with the WT values using ANOVA followed by Dunnett post-hoc analysis.

Figure 2. Expression levels of β_2 AR-Rluc and GFP2- β arr2 in double transgenic heterozygous mice. Double transgenic mice were generated by crossing the parental lines presented in Fig. 1. Expression levels in dispersed testis cells of the different crosses were monitored by luminescence emission from β_2 AR-Rluc (*A*) and fluorescence emission from GFP2- β arr2 (*B*) (left axes), and transformed into fmol/100,000 cells and pmol/100,000 cells, respectively, (right axes) as described in Fig. 1. Error bars represent the mean \pm SEM of measurements performed in at least three different experiments. * indicates $p < 0.05$ and ** indicates $p < 0.01$ for comparison with the WT values using ANOVA followed by a Dunnett post-hoc analysis.

Figure 3. Expression levels of β_2 AR-Rluc in tissue membrane preparation from double transgenic β_2 AR-1/ β arr2-1 mice. *A)* Expression levels of β_2 AR-Rluc transgene was

measured in 100 μ g of membrane preparation from kidney, testis, liver, spleen, heart, lung and brain using luminescence emission and correlated to pmol/mg of protein as described in *Materials and Methods*. *B*) Total number of β_2 AR sites was measured by [125 I]CYP radioligand binding assay. Inset, β ARs density on kidney, testes, liver and heart of the WT mice is magnified. Results are expressed as the mean \pm SEM of measurements performed in at least five (luminescence) and three ([125 I]CYP radioligand binding) different experiments.* indicates $p < 0.005$ in comparison with background values detected in the WT for each tissues using Student's t-test analysis.

Figure 4. Expression levels of GFP2- β arr2 fusion proteins in tissues of double transgenic β_2 AR-1/ β arr2-1 mice. *A*) Expression levels of GFP2- β arr2 transgene were monitored by measuring fluorescence on 100 μ g of soluble extracts from the indicated tissue. The fluorescence signal is expressed as specific relative fluorescence units (RFU, left axis), where the signal from WT mouse was subtracted. The fluorescence signal was transformed to molar quantities of GFP2- β arr2 (pmol/mg of soluble protein, right axis) as described in supplementary Fig. 1. Results are expressed as the mean \pm SEM of measurements performed in at least five different experiments. *** indicates $p < 0.0001$ in comparison with background values detected in the WT for each tissues using Student's t-test analysis. *B*) The presence of the endogenous β arr2 and the GFP2- β arr2 transgene was monitored by western blot using a rabbit anti- β arr2 antibody. β arr2 immunodetection of HEK293 cells transiently expressing GFP2- β arr2 was used as a control. Western blots are representative of three different experiments. *C*) Expression level of GFP2- β arr2 in a 5 μ m testes seminiferous tubule cross section from β_2 AR-1/ β arr2-1 mice was confirmed by fluorescence microscopy. Yellow arrows indicate Leydig cells. Fluorescence microscopy images are representative of four different experiments.

Figure 5. Receptor-promoted adenylyl cyclase activity in β_2 AR-1/ β arr2-1 and WT mice. *A*) Membrane preparations from testes of β_2 AR-1/ β arr2-1 and WT mice were incubated for 20 min with 1 μ M isoproterenol, 100 μ M alprenolol + 1 μ M isoproterenol, or ALF4 (10mM NaF and 10uM AlCl₃). Inset, the adenylyl cyclase activity represented as ligand-promoted stimulation. *B*) Concentration-dependent isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity in

testes membrane preparations from β_2 AR-1/ β arr2-1 and WT mice. EC₅₀ for isoproterenol stimulation is 117 ± 31 nM for the β_2 AR-1/ β arr2-1 double transgenic mice. Basal adenylyl cyclase activities were 6.853 ± 0.824 and 5.074 ± 0.413 pmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹ for the β_2 AR-1/ β arr2-1 and WT mice, respectively. Results are expressed as the mean \pm SEM of measurements performed in three independent experiments. * indicates $p < 0.05$ and *** indicates $p < 0.001$ for comparison with the WT values or as indicated by the solid lines using ANOVA followed by a Tukey post-hoc analysis.

Figure 6. β arr2 recruitment to the β_2 AR upon agonist stimulation. *A)* BRET signal was measured on freshly dispersed testicular cells from the double transgenic β_2 AR-1/ β arr2-1 or the parental β_2 AR-1 mice after treatment with vehicle, 1 μ M isoproterenol or 100 μ M alprenolol + 1 μ M isoproterenol, for 150 seconds. BRET signals are expressed as mBRET, determined as the ratio of acceptor emission (500-530nm)/donor emission (370-450nm) \times 1000, and represent the mean \pm SEM of six independent experiments. * indicates $p < 0.05$ using ANOVA followed by a Tukey post-hoc analysis. *B)* Concentration-response curve of the recruitment of β arr2 to the β_2 AR measured by BRET. Data are expressed as the mean \pm SEM of four to six independent experiments. + indicates $p < 0.05$ and ++ indicates $p < 0.01$ (as compared to baseline) using ANOVA followed by a Dunnett post-hoc analysis. *C)* Kinetics of the recruitment of β arr2 to the β_2 AR following isoproterenol stimulation measured by BRET. Data are expressed as the mean \pm SEM of 3 independent experiments. # indicates $p < 0.05$ and ## indicates $p < 0.001$ as compared to background values detected at the corresponding time in the vehicle treated β_2 AR-1/ β arr2-1 cells using Student's t-test analysis.

Figure 1

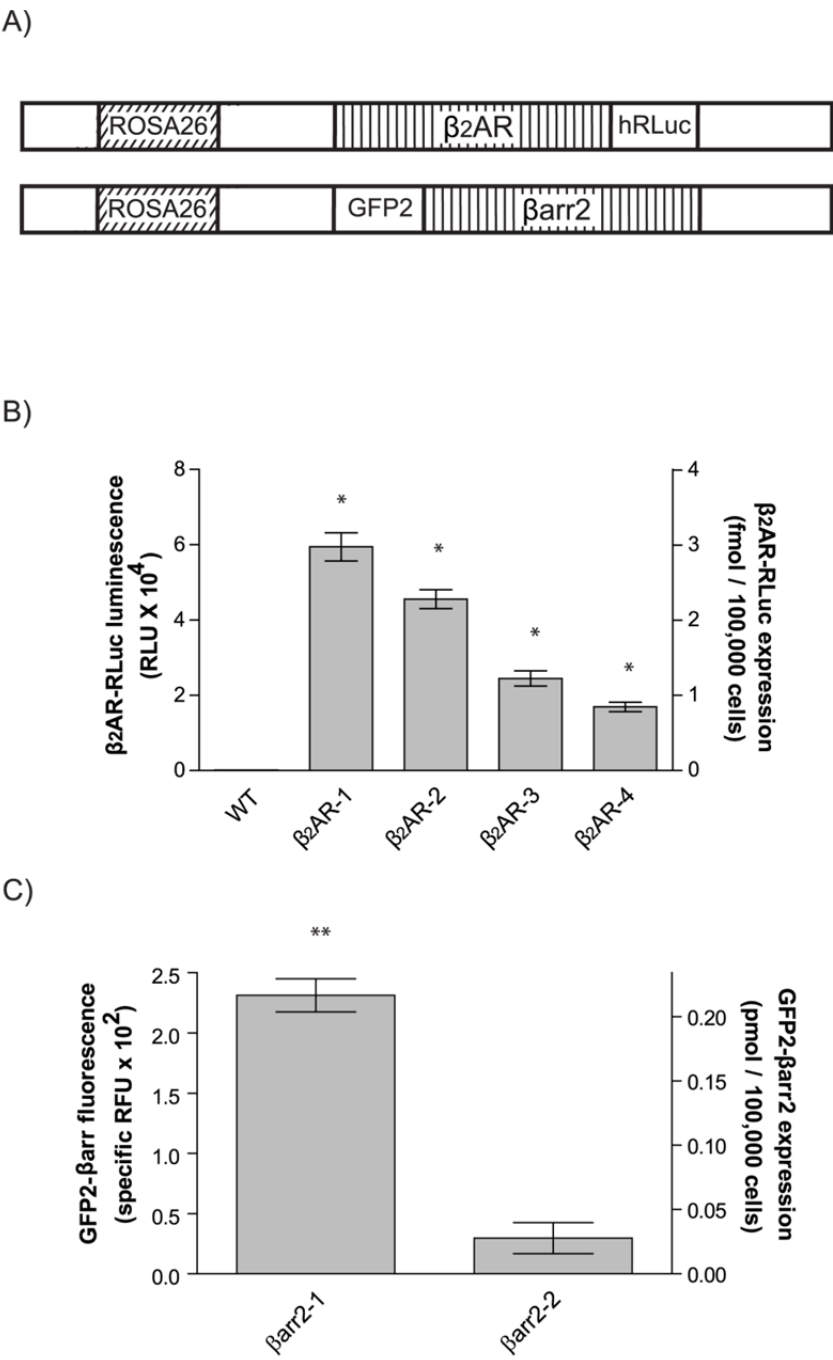
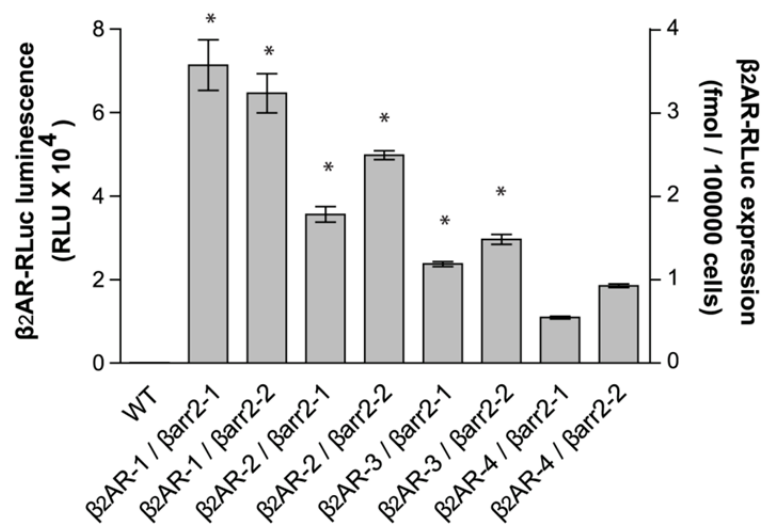


Figure 2

A)



B)

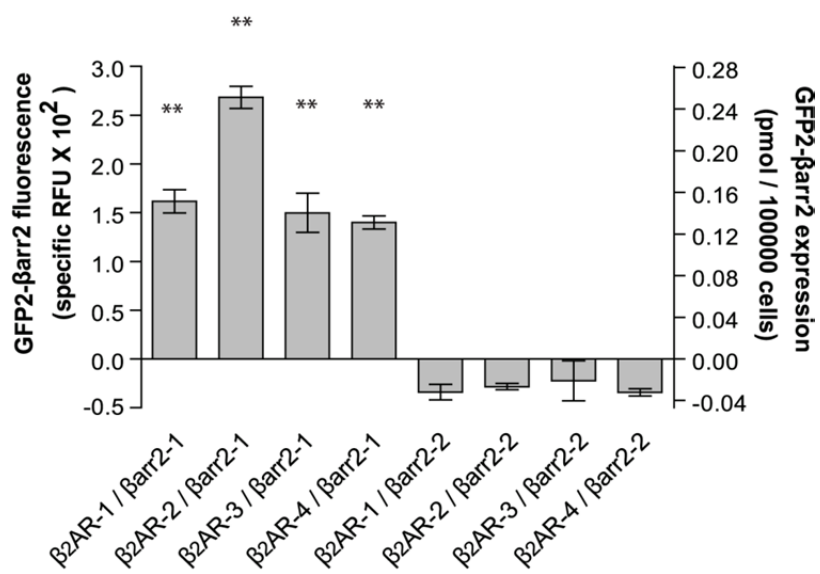


Figure 3

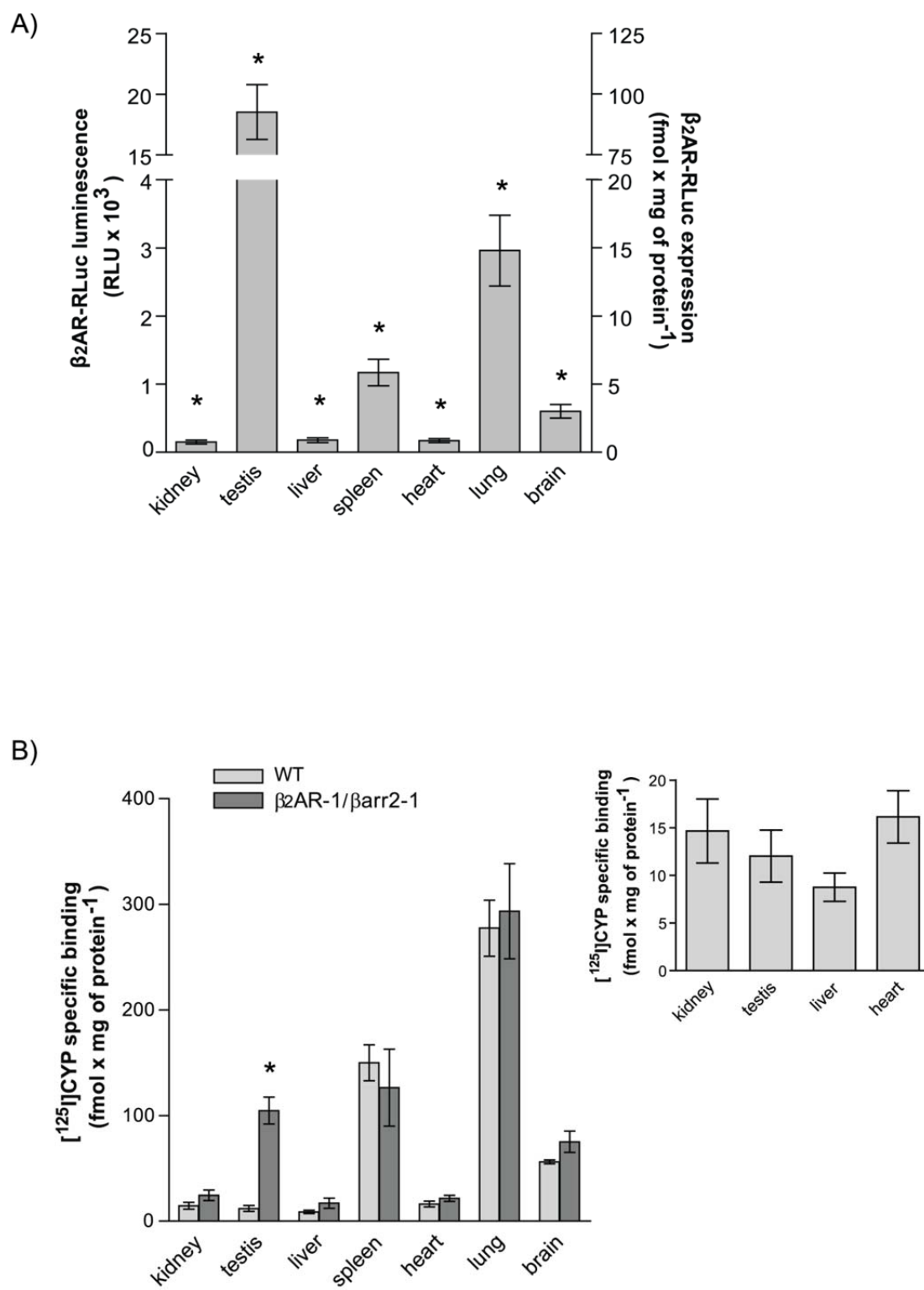


Figure 4

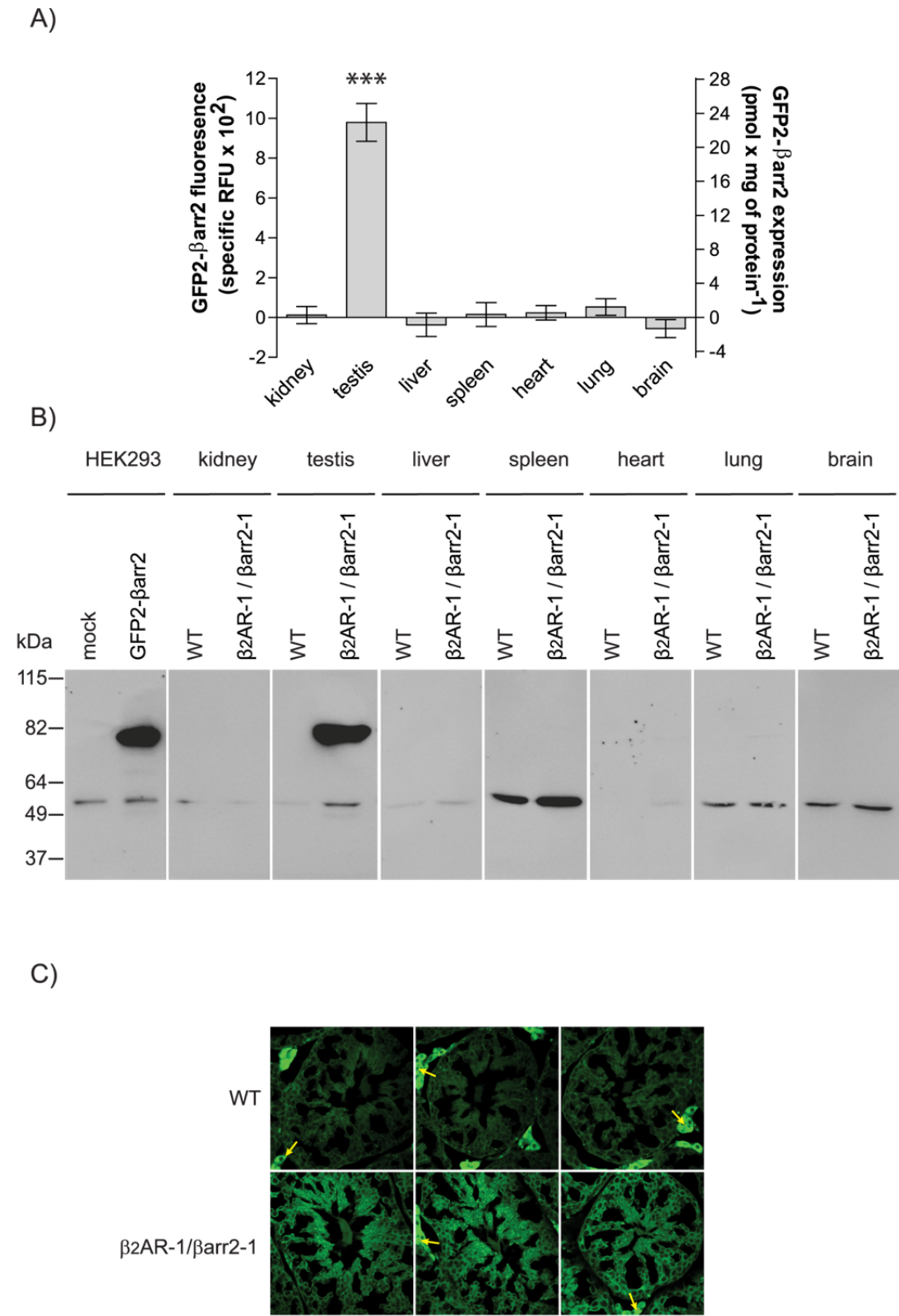
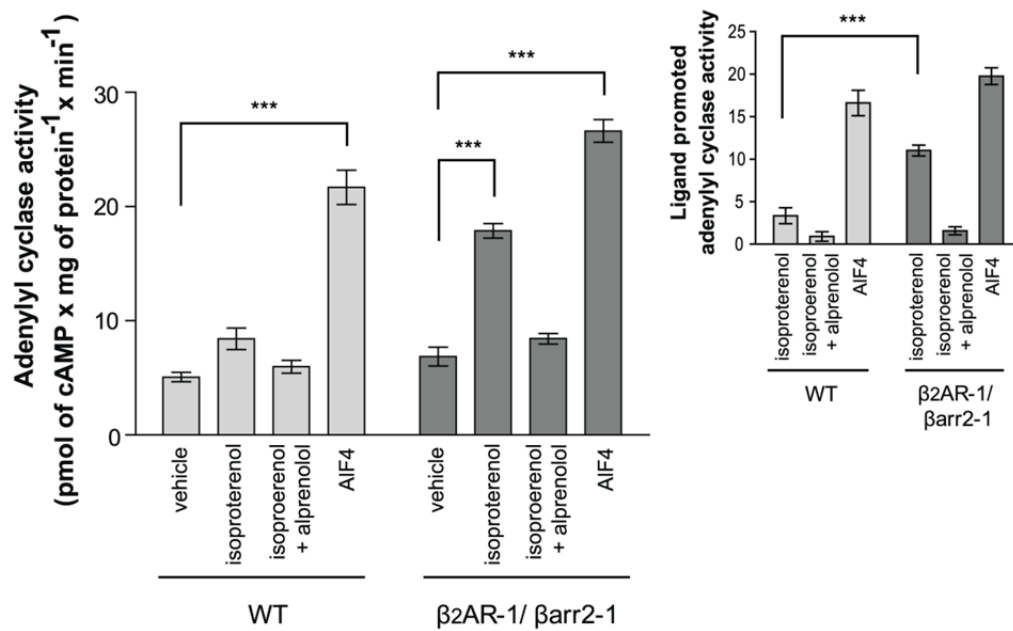


Figure 5

A)



B)

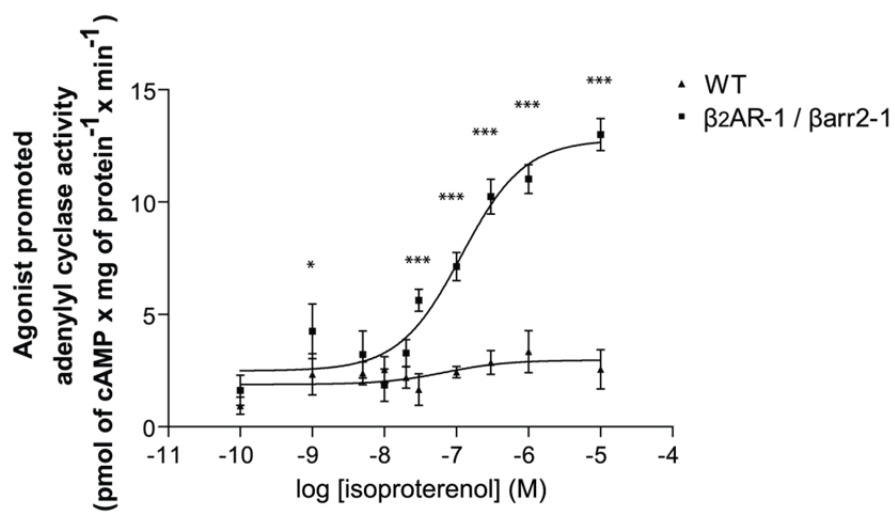
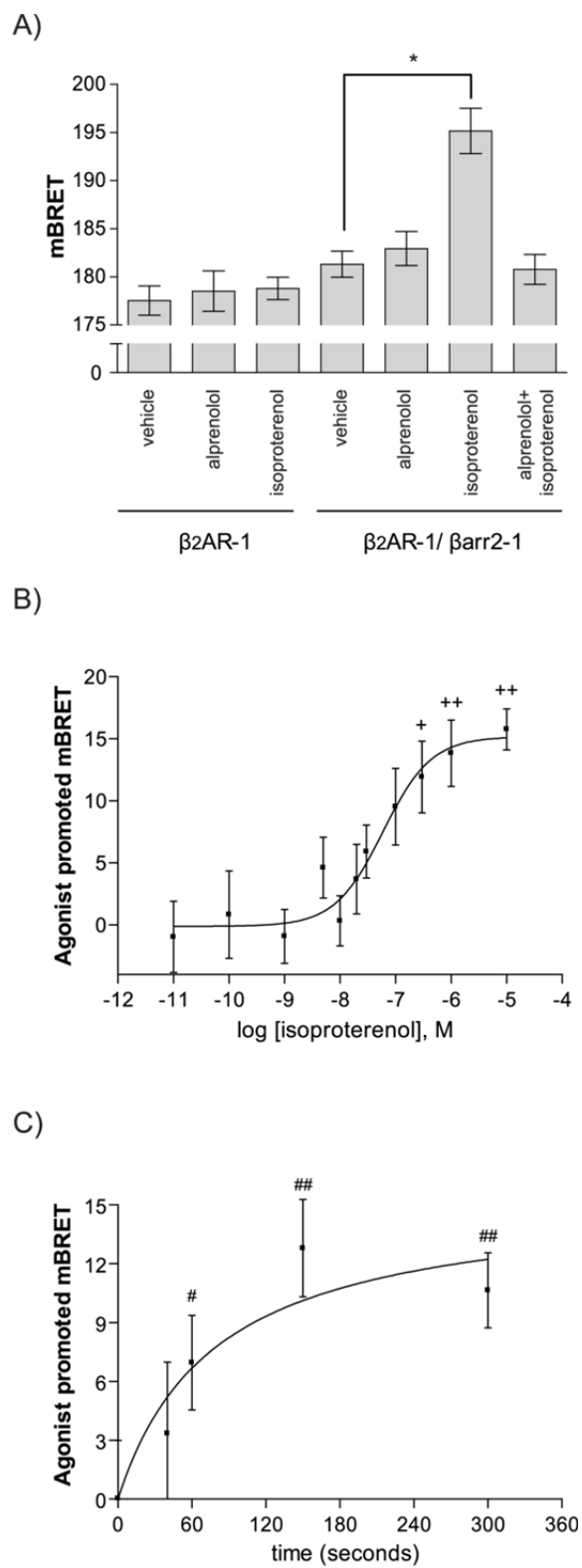


Figure 6



Article 4

β arrestins inhibitor discovery by combined virtual screening and cell-based assays

Martin Audet, Étienne Khoury, Wayne Stallaert, Viktoriya Lukasheva, Christian Legouill, Alexandre Beautrait, Stéphane A. Laporte and Michel Bouvier

Nature chemical biology, soumis

Contexte / objectifs: Les β arrests sont d'importants régulateurs des RCPGs et servent de protéines d'échafaudages pour l'engagement d'effecteurs de l'endocytose et de la signalisation biaisée des récepteurs. Malgré leur importance, il n'existe aucun inhibiteur pharmacologique ciblant spécifiquement les β arrests. Le développement de composés inhibiteurs serait un atout important pour confirmer les rôles cellulaires et physiologiques des β arrests, identifiés grâce aux outils génétiques. De plus, contrairement à ces derniers, l'inactivation aigüe des β arrests par un outil pharmacologique permettrait de déterminer de nouveaux rôles dans certains phénomènes comme le recyclage des RCPGs, dont l'endocytose est un pré-requis et dépend presque toujours des β arrests. Aussi, il permettrait d'identifier plus facilement la contribution des β arrests dans l'activation d'une voie de signalisation par un ligand biaisé dans les systèmes cellulaires et physiologiques. Ainsi, plusieurs structures cristallines des β arrests dans une conformation inactive avaient déjà été publiées au début de ce projet. Ces dernières montrent l'importance d'un réseau d'interactions électrostatiques, formant un coeur polaire situé au carrefour des principaux domaines des β arrests, dans la stabilisation de l'état inactif. Il a été ainsi proposé que l'activation des β arrests par la liaison des phosphates de la queue C-terminale des RCPGs implique une transition activatrice qui déstabilise le coeur polaire. L'accès au coeur polaire est partiellement obstrué par une boucle formée des résidus 64-74 (boucle *finger*) suggérant que cette dernière se déplace lors de la liaison de la queue C-terminale phosphorylée d'un récepteur. De manière intéressante, ces deux hypothèses ont été confirmées récemment par la

publication de la structure cristalline de la β arr1 liée à un peptide représentant l'extrémité C-terminale phosphorylée du V2R (Shukla et al., 2013). L'article 4 de ma thèse présente l'identification d'un inhibiteur des β arrs par une approche de criblage virtuel et d'essais cellulaires. L'hypothèse de cette étude est qu'un composé se liant sur le coeur polaire pourrait interférer avec l'action de la queue C-terminale phosphorylée du récepteur et stabiliser l'intégrité des interactions électrostatiques empêchant l'activation des β arrs. Nous avons pris avantage des structures cristallines des β arrs en conformation inactive pour dériver un modèle en déplaçant la boucle *finger* afin de libérer l'accès au coeur polaire. Ensuite, nous avons criblé virtuellement la surface concave du n-domaine des β arrs incluant le coeur polaire avec des bibliothèques commerciales de petits composés organiques. Les composés candidats ont été validés des essais d'inhibition de l'endocytose du V2R induit par un agoniste et contre-validés par un essai de recrutement de β arrs au récepteur. Le mode de liaison du composé le plus puissant, UM0012685, a été validé par mutagenèse et est en accord avec la compétition du composé et de la queue C-terminale phosphorylée des récepteurs pour la liaison du coeur polaire des β arrs en forme active. Ce composé bloque le recrutement des β arr1 et 2 au V2R avec des puissances similaires et l'activation des ERK1/2 dépendant de l'activation du V2R par la vasopressine. Il affecte aussi la dynamique de l'interaction entre la β arr2 et le V2R dans les endosomes. De plus, bien que le composé inhibe le recrutement de la β arr2 au β 2AR, il inhibe aussi le recyclage du récepteur indiquant un nouveau rôle des β arrs dans l'adressage post-endocytaire des récepteurs. Le composé UM0012685 est le premier inhibiteur des β arrs et représente un outil puissant pour l'étude de leurs fonctions cellulaires.

Contributions: Dans cette étude, j'ai conçu et réalisé toutes les expériences à l'exception de la microscopie. J'ai aussi rédigé le manuscrit sous la supervision de mon directeur de thèse.

βarrestins inhibitor discovery by combined virtual screening and cell-based assays

Martin Audet, Étienne Khoury, Wayne Stallaert, Viktoriya Lukasheva, Christian Legouill, Alexandre Beautrait, Stéphane A. Laporte and Michel Bouvier

Abstract

βarrestins (βarrs) are scaffolding proteins controlling G protein coupled receptor (GPCR) endocytosis and signalling activities. Despite their importance, no selective pharmacological inhibitor of their function exists. We conducted a virtual screen based on the crystal structure of βarr1 and identified compounds that inhibit the recruitment of βarr1 and 2 to receptors and block the ensuing endocytosis. The most potent inhibitor, UM0012685, also inhibits the βarr-dependent activation of ERK1/2, affects the dynamic of βarrs-receptor association in the endosomes and revealed a role for this interaction in the recycling of receptors following endocytosis. The computationally predicted binding mode of UM0012685 to βarrs was confirmed by mutagenesis studies that suggest a competition between the compound and the phosphorylated carboxyl tail of the receptors for the polar-core region of βarrs. In addition to validate virtual screening to identify βarrs inhibitors, the study provides a pharmacological tool to study the diverse functions of βarrs.

Introduction

Arrestins form a family of accessory proteins that play a central role in regulating G protein coupled receptors (GPCR) function. In mammals, 4 isoforms exist with arrestin1 and arrestin4 being mainly found in the photoreceptor cells of the visual system whereas arrestin2 and arrestin3, also known as β arrestin1 (β arr1) and β arrestin2 (β arr2), are ubiquitously expressed. As regulators of the largest class of membrane protein in the human genome that transduce signals from a wide variety of stimuli across biological membranes, they play a role in most physiological functions.

Originally discovered for their role in agonist-promoted desensitization and internalization of GPCRs following sustained activation, β arr1 and β arr2 were later found to have intrinsic signalling activities, namely through the scaffolding and activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPK). The scaffolding role of β arrs for both endocytosis and MAPK activation requires their recruitment from the cytoplasm to the receptor, linking the receptor to components of the clathrin-mediated endocytosis machinery such as adaptor protein-2 (AP2)¹ and clathrin² as well as to signalling molecules like c-Src³ and ERK1/2⁴. This process is greatly favoured by the phosphorylation of the receptors by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) that lead to an increased affinity of receptors for β arrs⁵. Receptors having a scattered distribution of phosphorylated residues on their C-termini have weaker interaction with β arr and rapidly recycle back to the plasma membrane whereas those with clusters of phosphorylated residues have stronger interaction and remain for extended times in endosomes before being targeted to lysosome for degradation⁶⁻⁸. These receptors are referred as class A and B, respectively.

Although β arrs have been shown to play a role in the endocytosis of numerous GPCRs, this is not universal since some GPCRs have been shown to undergo β arrs-independent endocytosis⁹⁻¹⁵. For several of these receptors, however, β arrs has been shown to be essential for the receptor recycling to the plasma membrane following endocytosis⁹⁻¹¹, thus suggesting a dual role of β arrs in receptor trafficking that may differentially affect different receptors. The

role of β arrrs in GPCR-stimulated MAPK activity has also been found to be highly variable from one receptor to another^{4, 16, 17}.

Since no selective pharmacological tool exists, all studies assessing the roles of β arrrs have relied on the use of genetic tools, including dominant negative mutants^{10, 12, 18, 19}, antisense- and siRNA- mediated knock-down^{11, 20-22} and cells derived from β arrrs knock-out mice^{9, 14, 15, 23-25}. This lack of pharmacological tool has hampered our ability to assess, on a large scale and in various biological systems, the relative contribution of β arrrs to the various functions in which they have been implicated. Yet, the structural information gathered about β arrrs and their mode of activation offer opportunities for the development of small molecular modulators. The structural features of the two β arrrs are strictly conserved and include an unstructured C-terminal tail and two β -sandwich folds called the N- and C-domains that bind phosphorylated receptors through their concave polybasic surface. At the interface of the N-domain, C-domain and the C-termini resides a polar core formed by an interacting network of electrostatic residues important to keep the β arrrs in their inactive state^{26, 27}. The phosphorylated carboxyl- tail of GPCRs binds to the β arrrs N-domain, thus leading to the disruption of the polar core and the release of the core-embedded C-termini region that contains the residues involved in the interaction with downstream effectors such as AP2²⁸⁻³¹. Compounds that could bind to the polar core region of β arrrs would therefore be predicted to modulate their receptor-mediated activation, thus providing useful tool compound to study β arrrs functions.

The aim of the present study was to identify small organic pharmacological modulators of β arr activity. For this purpose, a virtual screen was performed on a model derived from a β arr1 crystal structure using a grid that included the polar-core region as the target. The activity of the virtual hits were then experimentally tested on both signalling and trafficking functions, leading to the identification of the first pharmacological inhibitor of β arrrs. In addition to allow studying the role of β arrrs in agonist promoted endocytosis and MAPK activation, this new tool compound allowed to investigate the dynamic of β arr-receptor interactions in the endosomes and its role in receptor recycling.

Results

Virtual screening strategy

A major site of interaction between GPCRs and β arr for which known structural elements could guide the selection of the binding site of small organic modulators is the central electrostatic network at the interface of the N and C domains known as the polar core (**Fig. 1a**). For rhodopsin, type 1 cannabinoid receptor and type-2 vasopressin receptor (V2R), this region was reported to bind directly to the phosphorylated carboxyl tail of the receptor^{29, 30, 32, 33}. Therefore, the strategy selected to identify β arr modulators was to search for small molecules targeting the surface of the polar core of β arr using virtual screening. However, crystal structures show that the polar core is partially hidden by the ‘finger loop’ (residues 64-74 for β arr1), creating a lid that precludes direct access to its surface^{26, 34}. To allow access of small molecules to the surface of the polar core region, we used a β arr1 model derived from its crystal structure (1ZSH) in which loop 64-74 has been displaced out of the polar core entry (**Fig. 1a**, lower panel). The exposed solvent-accessible surface is conserved among β arr subtypes and species (**Fig. 1b**) and forms a pocket of 636 Å², including the polar core region, that was used to evaluate the binding energies of 30,000 compounds from three commercially available libraries (Myriascreen, Actiprobe10 and TimTec diversity sets from Sigma) (**Fig. 1c**). These libraries are structurally representative of a much larger collections of 2,500,000 drug-like compounds. These compounds were fitted in a docking grid using the genetic algorithm of the Autodock software (see methods). Ranking the 30,000 compounds according to their docking energy, 517 were found to have a predicted binding affinity of less than 2 μ M. In addition to these candidates, 91 closely related structural homologues were selected from 79,648 chemicals of the IRIC chemical library (<http://www.irc.ca/recherche/infrastructures/criblage-a-haut-debit/?section=technologies>), providing a total pool of 608 candidates. Among this pool, 66 candidates were acquired based on their availability and affordability and were further characterized (**Fig. 1c**).

Validation of candidates

To assess the potential action of these compounds on β arr functions, we first tested their effect on agonist-promoted GPCR endocytosis. **Figure 2a** illustrates that stimulation of the human type-2 vasopressin receptor (V2R) stably expressed in HEK293 cells with its natural agonist, arginine vasopressin (AVP) for 20 minutes led to significant endocytosis resulting in a loss of 59 % of the cell surface V2R as assessed by ELISA. To test the effect of the 66 compounds, we used a dual flow cytometry (FACS) assay that simultaneously detects the total and cell surface V2R expression, reflected by the intrinsic fluorescence of a C-terminal yellow variant of green fluorescent protein (venus) tag and immunofluorescence of a N-terminal HA tag, respectively. Such quantification revealed that 8 out of the 66 tested compounds significantly inhibited AVP-stimulated endocytosis when added to the cell at a concentration of 100 μ M, 10 minutes prior to AVP stimulation (**Fig. 2b**). The inhibiting activity of the 4 most efficacious compounds (23, 38, 52 and 57) was confirmed in dose-dependent curves (**Fig. 2c**), yielding inhibition of more than 50% of the endocytosis at maximal concentration. IC50s could be calculated for 3 of the compounds (23, 38, 57) with potencies between 6 and 32 μ M. None of these compounds had effect on receptor cell surface expression in the absence of AVP stimulation (**Supplementary Results** and **Supplementary Fig. 1**), indicating that the compounds selectively block agonist-promoted endocytosis.

To confirm the mechanism of action of the inhibitory compounds, we used a BRET-based assay that directly monitors the interaction between β arrs and GPCRs^{35, 36}. Six out of the 8 endocytosis inhibitors were spectrally active and interfered with BRET (**Supplementary Fig. 2**), thus only compounds 37 and 57 were further characterized.

Stimulation of cells with a saturating concentration of AVP promoted a significant increase in BRET (**Fig. 2d**), reflecting recruitment of β arr2-Rluc to the V2R-venus. Both compounds 37 and 57 significantly inhibited the AVP-stimulated BRET (**Fig. 2d**, left panel), indicating that they prevented the recruitment of β arr2 to the receptor. In the absence of AVP stimulation neither compound had an effect on the BRET signal (**Fig. 2d**, right panel). Two compounds (6 and 18) that did not affect AVP-stimulated endocytosis were used as negative control. They were without effect on the agonist-mediated recruitment to V2R, confirming the

selectivity of the assay. A dose response curve of the most potent endocytosis inhibitor (compound 57) revealed a logIC₅₀ of -5.5 ± 0.2 for the inhibition of β arr2 recruitment to the V2R (**Fig. 2e**), a value almost identical to that observed for the inhibition of endocytosis (-5.2 ± 0.2 ; **Fig. 2c**, lower right panel), consistent with a common mode of action of the compound for the two responses. Compound 57 also blocked the recruitment of β arr1-RLuc to V2R-venus with a comparable potency (logIC₅₀ -5.4 ± 0.2), indicating that the compound is an inhibitor of both β arr1 and β arr2 recruitment as expected from their highly conserved predicted binding surface (**Fig. 1b**). Given that the docking grid used for the virtual screen targeted one of the major binding sites of β arr to the receptor, it can be proposed that compound 57 acts by directly interfering with the association of β arr to the V2R. Consistent with this notion, compound 57 does not act as a competitive antagonist of the V2R as it did not affect [³H]-AVP binding to the V2R (**Supplementary Fig. 3**). Thus, compound 57 was selected for further analysis and will now be referred as compound UM0012685.

Predicted binding mode of UM0012685

Since UM0012685 harbors a chiral center on carbon 4 of the quinoline core moiety (**Fig. 3a**), both enantiomers were docked on the β arr model. The "S" enantiomer showed a 1.1 kcal / mol lower predicted binding energy than the "R" enantiomer and was thus used for binding mode analysis (**Fig. 3**). **Figure 3b** illustrates the pose of UM0012685 in the β arr1 binding pocket. Seven residues from the polar core region were predicted to directly contact UM0012685. The cyclopentyl group forms hydrophobic interactions with the side chains of residues Ser126, Thr128 and Val167 that, together, form a cavity at the bottom of the binding pocket. The bromophenyl group interacts with the guanidium group of Arg62 through the bromine atom whereas the side chain of Val167 coordinates the bromophenyl aromatic moiety. The nitrogens from Lys292 backbone and His295 side chain engage in electrostatic bonds with the carbonyl of the UM0012685 ester function. Similarly, the carbonyl of the Val167 backbone and the guanidium of the Arg393 side chain interact with the nitrogen of the compound quinoline core. Phe391 also forms hydrophobic contacts with the quinoline core on carbons 7 and 8.

To test the contribution of the predicted binding pocket on UM0012685 efficacy, the role of Phe391 and Arg393, which contribute to the formation of the polar core structure by anchoring the carboxyl terminal of β arr in the N-domain, was assessed by substitutions to alanine (F391A- β arr2; R393A- β arr2). As shown in **Figure 3c**, whereas UM0012685 inhibited the AVP-promoted recruitment of wild-type β arr2 to the V2R by 78%, the inhibitory action of the compound was significantly reduced to 46% and 45% for F391A- β arr2 and R393A- β arr2, respectively, confirming the importance of these residues for the action of UM0012685. Mutations of two other residues in the docking surface of β arr2 (D68A and Q131A), which are not predicted to interact with UM0012685, did not affect its inhibitory action, again supporting the binding mode proposed by the docking experiments. The fact that mutations Arg393 and Gln131 promoted greater AVP-stimulated β arr2 recruitment) is not surprising given the role of this region in the interaction with the receptor. However, their effect on the inhibitory action of UM0012685 was independent of such elevation since Q131A, which caused the greatest enhancement of the AVP-stimulated BRET, did not affect the inhibitory activity of UM0012685.

Also consistent with the binding mode proposed by the virtual docking are the results obtained with analogues of UM0012685 (**Fig. 3d**) where the bromine atom in the ‘para’ position of the phenyl group was substituted by either a hydrogen (compound 57a) or a methyl ester group (compound 57b). Whereas the hydrogen substitution, which cannot mimic the electrostatic halogen bonding with Arg62, abolished the inhibitory activity of the compound, the replacement with the methyl ester hydrogen bond acceptor preserved significant inhibitory activity (**Fig. 3d**). Taken together, these results indicate that UM0012685 acts through its binding to the polar core region of β arr2 thus most likely blocking access to the receptor carboxyl tail.

UM0012685 selectivity of action

To assess whether UM0012685 could inhibit the recruitment of β arr to other GPCR family members, UM0012685 was tested against agonist-stimulated recruitment of β arr2 to β 2-adrenergic receptor (β 2AR), platelet activation factor receptor (PAFR), type 1 angiotensin-

II receptor (AT1R) for which phosphorylation of their carboxyl tail has been shown to be important for the recruitment of β arr2^{6-8, 37}. As observed for the V2R, UM0012685 significantly blocked the agonist-promoted recruitment of β arr2 to these receptors (**Fig. 4**). However, it was without effect on the bradykinin-stimulated recruitment of β arr2 to the type-2 bradykinin receptor (B2R), which has been suggested to be independent of the receptor's carboxyl tail phosphorylation³⁸, consistent with the proposed action mode of UM0012685.

Indeed, since the phosphorylated carboxyl tail is believed to play its role by destabilizing the polar core interactions, resulting in the release of the C-termini from the N-domain and the opening of this region, the difference in the recruitment mode of β arr2 by the B2R most likely explains the lack of action of UM0012685 on the β arr2/B2R interaction. To test this hypothesis, we took advantage of a pre-activated mutant form of β arr2 that can interact with high affinity to non-phosphorylated receptors, β arr2R170E³⁹, presumably as a result of a spontaneous opening of the polar-core region. As shown in **Figure 4b**, contrary to what was observed for the wild type β arr2 (**Fig. 4a**, lower right panel), the bradykinin-stimulated recruitment of β arr2R170E was significantly blocked by UM0012685. Mutation of another residue located in the docking surface of β arr2, β arr2Q131A, did not have the same effect than the R170E activating mutation, confirming the selectivity of the effect. For V2R, UM0012685 similarly inhibited the AVP-promoted recruitment of both wild-type β arr2 (**Fig. 2d**) and β arr2R170E (**Fig. 4b**) to the V2R indicating that the effect of the Arg170 mutation on the inhibitory activity of UM0012685 is specific to the mode of engagement of β arr2 by the receptor. These data are consistent with a model whereby UM0012685 requires the opening of the polar core region of β arr2 to be active (**Supplementary Fig. 5**).

Probing β arr functions with UM0012685

To assess the usefulness of UM0012685 as a chemical tool to study different β arr functions, we first assessed the effect of the compound on a well-characterized signaling activity of β arr, the V2R stimulated ERK1/2 activation^{17, 20}. As shown in **Figure 5a**, UM0012685 significantly blocked the AVP-stimulated ERK1/2 activation while not

significantly affecting the FBS-stimulated activity, validating the use of UM0012685 to probe receptor-stimulated β arr functions.

Previous studies have suggested that stable interaction between GPCRs and β arr regulates the recycling of the receptor. In particular, it has been proposed that the lack of recycling of some GPCRs, known as class B receptors⁶, may result from their prolonged interaction with β arr in the endosomes. To test whether blocking β arr/receptor interaction could affect the recycling of either class B or rapidly recycling class A receptors, we assessed the effect of UM0012685 on the recycling pattern of V2R (class B) and β 2AR (class A). Recycling was assessed by monitoring the reappearance of receptors at the cell surface by ELISA after a 30 minutes treatment with agonists (to induce endocytosis) followed by the removal of the agonist and a recycling period of 60 minutes in the presence or absence of UM0012685. For both β 2AR and V2R, stimulation with agonists led to a ~ 30% reduction in cell surface receptor density, reflecting endocytosis (**Fig. 5b**). As expected for class B receptors, no reappearance of cell surface V2R was observed 60 minutes following the removal of the agonist whether in the presence or absence of UM0012685. In fact, the addition of UM0012685 led to further decrease in cell surface V2R, suggesting that it blocked the little recycling that could occur. For β 2AR, as expected for a class A receptor, 66% of the lost-cell surface receptor had reappeared 60 minutes after agonist removal. In the presence of UM0012685, this recycling was completely blocked. Taken together, these results indicate that UM0012685 treatment following endocytosis had little effect on the recycling pattern of V2R but largely impaired the recycling of the β 2AR, indicating that receptor/ β arr interaction may play an important role in class A receptor recycling.

The observation that UM0012685 did not favour the recycling of the V2R may appear paradoxical given the role proposed for the endosomal β arr/receptor interaction in restricting recycling. To directly test whether UM0012685 could directly influence the interaction between β arr2 and V2R in the endosome, we took advantage of recent data demonstrating dynamic association-dissociation cycles that can be observed using recovery after photobleaching⁴⁰. As shown in **Figure 6a**, V2R activation upon AVP treatment led, as previously reported, to the accumulation of the V2R-bound β arr2-YFP in endosomes that

appear as small circular discrete hollows in the cytoplasm⁸. Treating the cells with UM0012685 for 30 minutes, in the presence of the agonist, led to a significant reduction of the number of β arr-positive endosomes, consistent with UM0012685 inhibiting the association between V2R and β arr2 in the endosomes. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was then used to monitor the life-time of the β arr2/V2R complex in endosomes⁴⁰⁻⁴². As shown in **Figure 6b-d** UM0012685 led to a 47% reduction in the half-time of recovery after photobleaching from 47.07s to 24.93s (**Figure 6d**). A closely related compound that does not block the interaction between β arr2 and V2R did not affect the recovery after photobleaching (**Supplementary Fig. 4**), confirming the selectivity of action of UM0012685. These data are consistent with the idea that UM0012685 inhibits the interaction between V2R and β arr2 in the endosome resulting in an increased rate of exchange between the cytoplasmic fluorescent β arr2-YFP and the bleached endosomal-bound β arr2. Consistent with our observation that UM0012685 did not inhibit the BRET between B2R-YFP and β arr2-Rluc2, the half-time for the recovery after photobleaching for the endosomal B2R/ β arr2 complex was not significantly affected by the treatment with the compound (**Fig. 6d**). However, using a mutant form of the B2R harbouring the carboxyl tail of the V2R (B2R-V2RCT), UM0012685 significantly reduced the half-time of recovery after photobleaching for the endosomal β arr2 indicating that the mode of engagement of β arr by the phosphorylated tail of the receptor plays a critical role for the action of UM0012685 in endosomes.

Discussion

The combination of a virtual screening based on a model derived from a crystal structure with cell based assays lead to the identification of the first β arr inhibitor thus providing a pharmacological tool to directly study the functions of β arrs upon GPCR activation.

The target grid used for the virtual screening was based on the crystal structure of bovine β arr1 in a basal inactive state. Because we wanted to identify compounds that would interfere with the binding of the phosphorylated receptor's carboxyl tail, we modified the position of the loop 64-74 (also known as the finger loop) to allow access of compounds to the

polar core domain that is disrupted upon binding of the phosphorylated carboxyl tail of the receptor. In retrospect, this artificial modification of the structure turned out to be very similar to the position of the finger loop in the recently determined structure of both β arr1 and p44-arrestin in the active conformation^{30, 43}.

The virtual screen resulted in a pre-selection of virtual hits that allowed identifying 4 active compounds out of the 66 experimentally tested for a hit rate of 6%. This compares advantageously to the usual hit rate of 0.1% typically observed for traditional high throughput screens, thus validating the virtual screening approach and the model used. The virtual docking also allowed predicting a binding mode for the most active inhibitor, UM0012685, to β arr. This predicted binding site involves residues that either interact directly with the receptors' carboxyl tail (R62) or that are within β arr domains (C-tail and lariat loop) that are heavily displaced upon receptors' C-tail binding to β arr (F391, R393, H295, K292). Through binding to these residues, UM0012685 most likely stabilizes inactive basal states of β arr by competing with the receptor's C-tail for its interaction with R62 and by maintaining the C-tail of β arr in close apposition to its N-domain, thus creating steric hindrance for the binding of the receptor's C-tail (**Supplementary Fig. 5**). Moreover, stabilizing the lariat loop in inactive conformation precludes the correct positioning of the loop residues for receptor phosphates coordination, further decreasing receptor's C-tail binding. Although the relatively low solubility of the compound prevented the direct biophysical analysis of its binding site, the docking prediction is strongly supported by the observation that mutation of F391 and R393 greatly inhibited the action of UM0012685. The use of UM0012685 analogues also validated the interaction model (**Fig. 3d**).

The proposed binding mode in the polar core region is consistent with the observation that UM0012685 acts preferentially on the activated state of β arr following the opening of the finger loop promoted either by the binding of the receptor's carboxyl tail or the constitutive activation of β arr. This is supported by the observation that, whereas it does not inhibit the interaction between the WT- β arr2 and B2R, a receptor that does not rely on the phosphorylation of its C-tail³⁸, UM0012685 significantly blocked the recruitment of a constitutively activated form of β arr2 (R170E- β arr2) to the B2R. The role of the C-tail of the receptors in the activity of UM0012685 is also supported by the fact that, whereas the

compound did not affect the dynamics between the B2R and β arr in the endosome, it significantly affected the endosomal β arr-receptor dynamics for the V2R and for chimeric form of the B2R harbouring the V2R C-tail.

As expected, UM0012685 blocked agonist-promoted endocytosis of V2R with the same potency that it blocked β arr recruitment to the receptor, confirming its usefulness as a tool compound to study the canonical role of β arr in receptor endocytosis. It also blocked the well characterized β arr-dependent V2R-promoted ERK1/2 activation, confirming that it can also serve as an inhibitor of signalling downstream of β arrestin activation. Although not universal since it could not blocked β arr recruitment to the B2R, UM0012685 blocked β arr recruitment to several GPCRs, a property that should be expected from a direct inhibitor of β arr preventing its recruitment to GPCRs, making it a good tool to study the role of β arr activation by many distinct receptors.

In addition to inhibit the canonical action of β arr on endocytosis and ERK1/2 activation, UM0012685 was also found to block β 2AR recycling. Although such action of β arr had never been shown for the β 2AR, it had been proposed for receptors such as the N-formyl peptide ⁹, the glucagon¹⁰ and the CXCR7 chemokine¹¹ receptors. In fact, the absence, until now, of pharmacological inhibitors for β arr prevented to study the role of β arrs in the recycling of receptors that are endocytosed in a β arr-dependent manner. Indeed β arr gene inactivation or knockdown lead to inhibition of receptor endocytosis, making it impossible to study recycling. Our study shows for the first time that β arr can have a dual role and be important for both endocytosis and recycling of the same receptor. Although the mechanism by which β arr promotes recycling is unknown, it should be noted that β arr has been shown to interact with the ArfGAP, AGAP2, a protein involved in β 2AR recycling⁴⁴. UM0012685 should prove a useful tool to further study the role of β arr in β 2AR recycling and possibly other GPCRs.

For the V2R, a class B receptor that does not undergo recycling and remains associated for extended period with β arr in the endosome, UM0012685 inhibited such association in the endosome. Although it was previously suggested that the lack of recycling of class B receptors

results from the extended interaction with β arr⁶, UM0012685 did not restore V2R recycling. This suggests that the stable interaction with β arr may not be the principal determinant of receptor retention in the endosomes.

In conclusion, our study validates the combined use of virtual screening and cell based assays to identify small molecules interfering with the engagement of the polar core domain of β arrs by GPCRs and provides a novel tool compound to probe the different roles of β arrs in receptor trafficking and signalling.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr Monique Lagacé for critical reading of the manuscript. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants to M.B. (MOP-10501), and to S.A.L. (MOP-74603). M.B. holds a Canada Research Chairs in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. S.A.L. is a senior scholar from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec”.

Author Contributions

M.A. helped in constructing the calculation platform, did the virtual screening, designed and performed all the bench experiments except the microscopy and wrote the manuscript. E.K. performed the microscopy experiment and participated in writing the manuscript. S.A.L. supervised the microscopy experiment and participated in writing the manuscript. W.S. constructed the β arr2RLucII encoding vector. V.L. constructed the HA-AT1R encoding vector. M.B participated in the writing of the manuscript and supervised the experiments. C.L. built the calculation platform and helped in designing and supervising the experiment. A.B. helped for the compound mining in the in-house library database.

Competing Financial Interests

The authors declare no competing financial interests.

Legends

Figure 1. Virtual screening strategy. (a) Ribbon representation of β arr1 crystal structure (PDBID: 1zsh, upper panel) and the β arr model used for the virtual screening (lower panel). Transparent surfaces overlaid are the docking area (magenta) and loop 64-74 (green). Residues R169, D290, D297 and R393 from the polar core structural motif are represented as magenta sticks. (b) Multiple alignments of β arr1 and β arr2 protein sequences from different species using T-coffee algorithm⁴⁵. Sequences are from genbank (human β arr1: AAH03636.1, human β arr2: AAH67368.1, bovine β arr1: NP_776668.1, bovine β arr2: NP_001192206.1, rat β arr1: AAA74459.1, rat β arr2: AAH87578.1). Black arrows indicate residues located in the docking area. (c) Flowchart of the virtual screening approach.

Figure 2. Validation of the virtual screen candidates. AVP-mediated V2R endocytosis in cells stably expressing HA-V2R-venus detected by (a) ELISA and (b,c) FACS. Cells were pre-treated with vehicle or candidates (100 μ M (b) or as indicated (c), 10 min), then stimulated with vehicle or AVP (100 nM, 20 min). $\log IC_{50} \pm$ s.e.m. are -4.6 ± 0.2 (compound 23), -4.5 ± 0.1 (compound 38) and -5.2 ± 0.2 (compound 57). (d-e) AVP-mediated β arrs interaction with V2R detected by BRET. (d) Cells stably expressing V2R-venus and β arr2-RLuc were pre-treated with vehicle or candidates (100 μ M, 10 min) and then treated with vehicle or AVP (100 nM, 40 min). (e) Cells transiently expressing V2R-eYFP with β arr1-RLucII or β arr2-RLucII were pre-treated (25 min) with increased concentration of compound 57 and then treated with AVP (100 nM, 5 min). $\log IC_{50} \pm$ s.e.m. are -5.4 ± 0.2 (β arr1) and -5.5 ± 0.2 (β arr2). Data represent the mean \pm s.e.m of 3 to 8 independent experiments. Significance against 100% cell surface receptor expression (ELISA assay) was determined using one-sample t test (**** $P < 0.0001$). Significance against vehicle pre-treated / AVP-treated sample in the FACS assay was determined using ANOVA followed by Tukey's test. (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). Significance against vehicle ((d), right panel) or vehicle pre-treated / AVP-treated ((d), left panel) sample was determined using ANOVA followed by Dunnett's test (*** $P < 0.001$).

Figure 3. Validation of predicted UM0012685 binding mode. (a) UM0012685 two-dimensional structure. Arrow indicates chiral center on carbon 4 of the quinoline group.

UM0012685 is cyclopentyl 4-(4-bromophenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-3-quinolinecarboxylate. **(b)** Predicted binding mode of UM0012685 on the polar core region of β arr1 model. Free binding energy predicted for S and R enantiomers are -6.53 and -5.39 Kcal/mol, respectively. S enantiomer (sphere or stick) docked on β arr1 model (ribbons overlaid with transparent surface or ribbons alone). β arr1 residues in close proximity of UM0012685 are represented as sticks. Dotted lines represent electrostatic interactions. Bromine, nitrogen and oxygen are colored in salmon, dark blue and red, while UM0012685 and β arr1 carbon atoms are colored in magenta and light blue, respectively. **(c)** AVP-mediated recruitment of β arr2 mutants to V2R detected by BRET. Cells transiently expressing V2R-eYFP and the indicated β arr2-RLucII mutants were pre-treated with UM0012685 (100 μ M, 25 min), then treated with AVP (100nM, 5 min). Inset shows the percentage of BRET-signal inhibition. **(d)** BRET measured on the same cells as **Figure 2d**, pre-treated (10 min) with increased concentration of the indicated analogous compounds followed by AVP treatment (100 nM, 20 min). "R" indicates the position of chemical substitutions. $\log IC_{50} \pm$ s.e.m. are -5.5 ± 0.1 (UM0012685), -5.0 ± 0.3 (compound 57a), -4.1 ± 0.1 (compound 57b). Data are the mean \pm s.e.m of 3 independent experiments. Significance against vehicle or wt- β arr2 (inset) was determined using two-tailed unpaired student t-test and ANOVA followed by Bonferroni's test, respectively ($***P < 0.001$; $**P < 0.01$; $*P < 0.05$).

Figure 4. UM0012685 activity on β arr2 recruitment to several GPCR. **(a)** Cells transiently expressing one of the following receptors(β 2AR-YFP, PAFR-venus, AT1R-venus and B2R-eYFP) along with either β arr2-RLucI (with PAFR and AT1R) or β arr2-RLucII (with β 2AR and B2R) were pre-treated with UM0012685 (100 μ M, 25 min) followed by 5 min treatment with either isoproterenol (10 μ M), platelet activating factor (PAF) (100 nM), angiotensin II (1 μ M) or bradykinin (1 μ M), respectively. Agonist induced β arr2 recruitment was then measured by BRET. **(b)** Similarly to **(a)** but using B2R-eYFP or V2R-eYFP and the indicated variant of β arr2-RLucII. Data represent the mean \pm s.e.m. of 3 to 7 independent experiments. Significance against vehicle pre-treated was determined using two-tailed unpaired student t-test. ($***P < 0.001$; $**P < 0.01$).

Figure 5. UM0012685 action on GPCR trafficking and signaling. (a) AVP-mediated ERK1/2 activation monitored by western blot. Same cells as **Figure 2a,b,c** were pre-treated with vehicle or UM0012685 (100 μ M, 10 min), and then treated with vehicle, AVP (1 μ M, 2 min) or fetal bovine serum (FBS, 10%). Data represent the mean \pm s.e.m of signal quantification for at least 3 independent experiments. (b) Cell surface receptors reappearance after agonist-stimulated receptor endocytosis (recycling) monitored by ELISA. Cells transiently expressing 3HA-V2R (upper panel) or HA- β 2AR (lower panel) were treated (30 min) with vehicle, AVP (100 nM) or isoproterenol (10 μ M) as indicated to induce receptor endocytosis. The samples were then washed extensively to remove any ligand and treated with vehicle or UM0012685 (100 μ M, 60 min). Data represent the mean \pm s.e.m of 4 independent experiments. Significance for ERK1/2 experiment against vehicle pre-treated sample was determined using one sample t-test (AVP) or two-tailed unpaired student t-test (FBS). Significance for recycling experiment was determined using an ANOVA followed by a Tukey's tests. ($***P < 0.001$; $**P < 0.01$; ns = non-significant).

Figure 6. UM0012685 impact on β arr2/V2R complexe lifetime in endosomes. (a) β arr2 localization in endosomes monitored by confocal microscopy. Cells transiently expressing HA-V2R and β arr2-YFP were pre-treated with AVP (1 μ M, 15 min), then treated or not (vehicle) with UM0012685 (100 μ M, 30 min). Micrographs are representative confocal images of YFP fluorescence where cell circumference is drawn in yellow. Bar graph shows endosomes density. Data are the mean \pm s.e.m. of 3 independent experiments (15-22 cells). (b,c,d) Dynamic of β arr2 association with agonist-induced endosomes monitored by FRAP. Cells transiently co-expressing V2R, B2R, or B2R-V2CT along with β arr2-YFP were pre-treated (15 min) with AVP or bradykinin (1 μ M), then treated or not (vehicle) with UM0012685 (50 μ M, 30 min). (b) Representative images of FRAP experiment for AVP pre-treated V2R expressing cells, comparing vehicle and UM0012685 treatment. Immediately after UM0012685 treatment, endosomes were selected (arrows), and one was bleached. Fluorescence recovery rate of the bleached endosome was monitored every 30 sec for 2 min and compared to a non-bleached endosome. Top left inset box represents enlargement of the pre-bleached and bleached endosome. Bottom right box is the control unbleached endosome. Scale bar is 10 μ m. (c) Linear regression analysis of recovery rates from b. (d) Calculated

half-life of β arr2 recovery on endosomes from agonist pre-treated V2R, B2R, or B2R-V2CT expressing cells. Data are the mean \pm s.e.m. of at least 3 independent experiments, for 17-20 endosomes. Significance was determined using two-tailed unpaired student t-test. (** $P < 0.01$; ns = non-significant).

Online Methods

Material. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, glutamine and phosphate buffer saline (PBS) was from Wisent (ST-Jean-Baptiste, QC, Canada). Cell culture plates, dishes and costar 96 wells v-bottom polypropylene plates were from Corning (Tewksbury, MA). Bovine Serum Albumin (BSA), Hygromycin B, 8-Arginine-Vasopressin (AVP), Platelet Activating Factor (C_{16}), AngiotensinII and (-)-Isoproterenol were from Sigma (St-Louis, MO). Candidate compounds were from Sigma (St-Louis, MO) and Chembridge (San Diego, CA). Polyethylenimine (PEI) 25 kD for DNA transfection was from Polysciences, Inc (Warrington, PA). All DNA restriction enzymes are from New England Biolab (Ipswich, MA). Coelenterazine h was purchased from Prolume (Pinetop, AZ). The mouse monoclonal anti-HA.11 antibody (16B12) was from Covance (Princeton, NJ). The rat monoclonal anti-HA (3F10) horseradish peroxidase-conjugated antibody was from Roche (Mississauga, ON, Canada). The chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 647 antibody, Lipofectamine2000 and pcDNA3.1zeo(+) were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). All oligonucleotide were synthesized at Biocorp (Montréal, QC, Canada) except those for pIRESpuro3a vector that were from IDT (Coralville, IA). Polyornithine was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). DCtm protein assay was from Biorad (Mississauga, ON, Canada). Optiplate and Culturplate microplates were from PerkinElmer (Wellesley, MA).

Plasmids and constructs. The expression vectors pIREShygro3 and pIRESpuro3 were from Clontech (Mountain View, CA). The expression vector phRLuc-N2 was from Perkin-Elmer (Montréal, QC, Canada). The expression vector pcDNA3.1Zeo(+) was from InVitrogen (Burlington, ON, Canada). The expression vector pcDNA3.1(+)-3HA-V2R was from Missouri S&T cDNA resource center (Rolla, MO). The plasmids encoding HA- β 2AR⁴⁶, β arr1-RLucII⁴⁰, B2R-YFP⁴⁷, HA-V2R⁸, HA-B2R⁴⁷, B2R-V2CT⁴⁷, β arr2-YFP⁴⁷, V2R-venus³⁶, β arr2-

RLucI³⁶ has been described previously. To create pIRESpuro3a vector, two complementary oligonucleotides (5'- aattcagggatccagtgtacagactcgagtcgc-3' and 5'-ggccgcgactcgagtcgtacactggatccctg-3') containing alternative restriction sites were hybridized and inserted in pIRESpuro3 vector using *EcoRI* and *NotI* restriction enzymes. To make pIRESP-HA-venus vector, the *venus* gene was PCR amplified and inserted into pIRESP-HA vector described previously⁴⁸. To make HA-PAFR-venus encoding plasmid, *PAFR* gene was PCR amplified and inserted in pIRESP-HA-venus vector by recombination using In-Fusion PCR Cloning Kit from Clontech (Mountain View, CA). The HA-AT1R-venus encoding vector was made by replacing HA-PAFR gene in the HA-PAFR-venus encoding plasmid by an amplified HA-AT1R gene with a signal peptide (MKTIIALSYIFCLVFA) at the N-terminus. The plasmid encoding HA-V2R-venus was made in two cloning step. First, HA-V2R gene was PCR amplified from pcDNA3.1(+)-3HA-V2R plasmid, keeping one HA tag and removing the stop codon. The PCR product was then inserted in pIRESpuro3a vector. Then, the *venus* gene was PCR amplified from pRLuc-venus vector previously described³⁶ and inserted in pIRESpuro3a-HA-V2R. The resulting *HA-V2R-venus* fusion gene was then inserted into pIREShygro3 vector, yielding pIREShygro3-HA-V2R-venus plasmid. To make 6his- β 2AR-YFP encoding vector, the *his- β 2AR-eYFP* fusion sequence, consisting of a 6 x histidine tag, the human β 2AR sequence, a linker and the *eYFP* sequences, was inserted into pcDNA3.1zeo(+) vector. To make β arr2-hRLucII encoding vector, the coding sequence of human β arr2 gene was amplified by PCR and inserted in the previously described pcDNA3.1-GFP10-EPAC-hRLucII vector⁴⁹, removing the *gfp10-epac* gene in the process. To make the β arr2 mutants (R170E, Q131A, F391A, D68A, R393A), two pairs of oligonucleotides containing the mutation were used to amplify the wild type β arr2 gene. The two overlapping fragments were passed through a second round of amplification using the two oligonucleotides hybridizing at both extremities of the β arr2 gene. The mutated amplified β arr2 genes were then inserted in pcDNA3.1 β arr2-hRLucII, replacing the WT- β arr2 sequence. All clones were verified by sequencing.

Transfection, cell culture and stable cell line generation. HEK293T cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 2mM glutamine, 0.1 unit/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were transfected using a PEI transfection procedure. Briefly, PEI and DNA were mixed at a 3:1 mass ratio in DMEM, incubated for 15

min at room temperature and added to HEK293 cells. Two μg of DNA in 200 μl of DMEM and 10 μg of DNA in 1 ml of DMEM was used for 6 wells culture plate and 100 mm petri dishes, respectively. Culture medium was changed after 2 hours. Experimental procedures were performed 24 to 48 hours after transfection. Generation of the HEK293 cells stably expressing the fusions protein V2R-venus and β arr2-RLuc has been previously described ³⁶. HEK293 cells stably expressing hRLuc and 2HA-V2R-venus proteins were created by transfecting phRLuc-N2 or HA-V2R-venus encoding vector using lipofectamin 2000 according to manufacturer's recommendation. Twenty-four hours post-transfection, cells were seeded 1/100 in 100 mm petri dishes. Cells were then selected using G418 (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, phRLuc-N2) or hygromycin B (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, pIRESHygro3HA-V2R-venus). After one month of selection, polyclonal population were frozen.

Virtual screening and molecular docking. ChemAxontm and Openbabel softwares were used to derive 3D coordinates from compound libraries. MGLTools 1.5 software was used to prepare compounds for docking energy evaluation by Autodock4 software. Side chains or backbone of residues R62, S126, T128, Q130, V142, D143, E145, L166, V167, I168, R169, L289, D290, G291, K292, H295, D297, T298, F391, A392, R393 are forming the docking surface on β arr model. For each compound, 30 (**Fig. 1**) rounds of energy evaluation were performed using genetic / local search hybrid algorithm and similar conformations (RMSD < 2 Å) were regrouped. The docking results were then analysed using MGLTools-1.5 software. The conformation having the best affinity within the largest group (**Fig. 1**) was retained to sort compounds by order of decreased affinity. Structural homologues (95 % structural identities) of the selected candidates in the IRIC library were selected using ChemAxontm software. For the docking of UM0012685 enantiomers (**Fig. 3**), 100 rounds of energy evaluation were performed, the conformation with the best overall affinity (**Fig. 3**) being retained for further analysis. Energy evaluation and data analysis has been automatized using bash shell scripting. Two-dimensional compounds representations were generated with ChemBioDrawtm Software (CambridgeSoft). Three-dimensional molecular representations were generated using Pymol software (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC).

ELISA assay. HEK293 cells expressing HA-tagged receptors or HA-V2R-venus (**Fig. 1a**) were resuspended and plated at a density of 50,000 cells per well in a 96 wells white Culturplate microplates pre-treated with poly-ornithine. Following an additional 24 hours, cells were washed twice with PBS, subjected to the indicated pharmacological treatment at room temperature (**Fig. 2a**) or 37°C (**Fig. 7b**), fixed with 3% paraformaldehyde and rinsed three times with PBS. Non-specific antigen sites were blocked with PBS containing 0.5% BSA prior to the labelling of the HA tag on the cell surface using an horseradish (HRP)-conjugated anti-HA antibody for 1 hour. Excess antibody was removed by rinsing the cells three times with PBS. HRP chemiluminescence reactions were monitored shortly after the injection of Western Lighthning Plus ECL, an HRP substrate, using a Mithras LB940 microplate reader without any emission filter. Receptor cell expression was normalized using GraphPad software, the receptor-expressing cells and mock exposed to vehicle being set as 100 % and 0%, respectively.

FACS assay. HEK293 cells stably expressing the human type-2 vasopressin receptor (V2R) tagged at its N-terminus with a haemagglutinin (HA) epitope and fused to a yellow variant of the green fluorescent protein (venus) at the C-terminus (HA-V2R-venus) were washed twice and resuspended in HEPES tyrode's Buffer (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1mM CaCl₂, 12mM NaHCO₃, 5,6mM D-glucose, 0,49mM MgCl₂, 0,37mM NaH₂PO₄, 25mM HEPES pH 7,4). Four hundred thousand cells, dispensed per well in a 96 wells v-bottom polypropylene plate, were subjected to the indicated pharmacological treatment at room temperature. Cells were then kept at 4°C to prevent further trafficking events, pellet by short centrifugation and buffer medium was removed. Cells were then shortly incubated in HEPES Tyrode's buffer supplemented with 1% BSA to block non-specific interaction followed by 30 min incubation with anti-HA.11 mouse monoclonal antibody in the same buffer . Cells were then washed twice with HEPES Tyrode's buffer / 1% BSA to remove excess of the primary antibody and incubated with anti-mouse Alexa Fluor 647 fluorescent antibody for 30 min. Cells were then washed twice with HEPES Tyrode's buffer / 1% BSA and once with HEPES Tyrode's buffer prior to being resuspended in HEPES Tyrode's buffer. Cells were analyzed using a LSR II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) set to detect in distinct channels. Venus fluorescent protein was excited with a sapphire blue laser (20 mW, 488 nm) and detected

through longpass 505 ± 15 nm followed by 530 ± 15 nm emission filters. Alexa Fluor 647 was excited with a HeNe laser (18 mW, 633 nm) and detected through a 660 ± 10 nm emission filter. Percentage of AVP-induced V2R endocytosis was determined as follow: HA vs venus signals representing the surface and total receptor expression, respectively, were plotted as X and Y axis on a two dimensional graph. Vehicle- and agonist-treated samples were compared and a polygonal gate was drawn around the dynamic population. Percentage of AVP-mediated endocytosis was determined using graphpad software normalization function by setting the 0% of endocytosis as the fraction of total cell in the gate after vehicle stimulation and 100 % as the fraction of total cell in the gate after AVP stimulation. Data analysis was performed using BD FACSDiva software.

BRET on stable cell line. One hundred thousand HEK293 cells expressing V2R-venus and β arr2 fused to *Renilla* luciferase (RLuc) at its C-terminus (β arr2-RLuc) and resuspended in HEPES tyrode's Buffer were dispensed per well of a 96-wells white Optiplate microplates from PerkinElmer (Wellesley, MA). Following the indicated pharmacological treatment at room temperature (RT), 5 μ M final concentration of coelenterazine-*h* was added to the cells suspension and luminescence signals were collected using a Mithras LB940 microplate reader from Berthold Technology (Bad Wildbad, Germany). BRET ratio is defined as the signal detected through energy acceptor filter (530 ± 20 nm) over the one detected through energy donor emission filter (480 ± 20 nm). The net BRET is the BRET ratio in the presence of the energy donor and acceptor pair minus the BRET ratio obtained only in the presence of an energy donor (see **Supplementary Fig. 1**).

BRET on transiently transfected cells. Twenty-four hours after transfection, HEK293 cells expressing BRET pair were resuspended and plated at a density of 50,000 cells per well in a 96 wells white Culturplate microplates pre-treated with poly-ornithine and then cultured for an additional 24 hours. The attached cells were then washed twice with HEPES tyrode's buffer and subjected to the indicated pharmacological stimulations at 37°C prior to coelenterazine-*h* addition and luminescence signal reading, as described above. Ligand-induced BRET is the BRET ratio from ligand-treated cells minus BRET ratio from vehicle-treated cells.

Western blotting. ERK1/2 was monitored as previously described²⁰. Pharmacological stimulations were performed at 37°C. Only 25 % of the total FBS-stimulated samples were loaded on the gel. Specific bands were detected using a LAS-3000 CCD camera device from Fujifilm and their densitometric analysis performed using Multi Gauge software from Fujifilm.

Confocal microscopy. HEK293 cells were plated in 35 mm glass bottom dishes and transfected with the indicated receptor and β arr2-YFP. Forty-eight hours post-transfection, cells were serum starved, stimulated with the indicated agonists to induced endosome formation followed by a stimulation with the indicated compounds prior to imaging of β arr2-YFP fluorescence. Two thousand forty-eight by 2048 pixels images were acquired at the indicated time. For fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), selected endosomes were bleached and fluorescence recovery was monitored over a period of 3 min with images acquisition every 30 seconds. The region of interest was bleached for 100 iterations using 514 nm laser set at 100% intensity. Images were collected on a Zeiss LSM-510 Meta laser scanning microscope with a 60x oil immersion lens using an Argon 2 laser with single line excitation at 514nm, and emission BP 530-600 nm filter sets for YFP. Fluorescence intensity data are expressed as percentage recovery in function of time (second) using GraphPad software (Prism) and converted into a linear regression plot to obtain maximal recovery and half-time recovery of the endosomal β arr2 / receptor complex, as described previously^{40, 41}. For quantification, endosomes were selected as round hollows displaying a diameter of less than 1 μ m and their density was determined using ImageJ software.

Statistical analysis. Statistical analysis and curve regression were carried out using GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software Inc.).

References

1. Laporte, S.A. *et al.* The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 3712-3717 (1999).

2. Goodman,O.B., Jr. *et al.* Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450 (1996).
3. Luttrell,L.M. *et al.* Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661 (1999).
4. Luttrell,L.M. *et al.* Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 2449-2454 (2001).
5. Sohlemann,P., Hekman,M., Puzicha,M., Buchen,C., & Lohse,M.J. Binding of purified recombinant beta-arrestin to guanine-nucleotide-binding-protein-coupled receptors. *Eur. J. Biochem.* **232**, 464-472 (1995).
6. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Caron,M.G., & Barak,L.S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 17201-17210 (2000).
7. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S., & Caron,M.G. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 19452-19460 (2001).
8. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S., & Caron,M.G. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **274**, 32248-32257 (1999).
9. Vines,C.M. *et al.* N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J. Biol. Chem.* **278**, 41581-41584 (2003).
10. Krilov,L., Nguyen,A., Miyazaki,T., Unson,C.G., & Bouscarel,B. Glucagon receptor recycling: role of carboxyl terminus, beta-arrestins, and cytoskeleton. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **295**, C1230-C1237 (2008).
11. Mahabaleshwar,H., Tarbashevich,K., Nowak,M., Brand,M., & Raz,E. beta-arrestin control of late endosomal sorting facilitates decoy receptor function and chemokine gradient formation. *Development* **139**, 2897-2902 (2012).
12. Iacovelli,L. *et al.* Role of G protein-coupled receptor kinase 4 and beta-arrestin 1 in agonist-stimulated metabotropic glutamate receptor 1 internalization and activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 12433-12442 (2003).

13. Vrecl, M. *et al.* Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol. Endocrinol.* **12**, 1818-1829 (1998).
14. Fraile-Ramos, A., Kohout, T.A., Waldhoer, M., & Marsh, M. Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway. *Traffic.* **4**, 243-253 (2003).
15. Paing, M.M., Stutts, A.B., Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J., & Trejo, J. beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J. Biol. Chem.* **277**, 1292-1300 (2002).
16. Shenoy, S.K. *et al.* beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **281**, 1261-1273 (2006).
17. Oligny-Longpre, G. *et al.* Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**, E1028-E1037 (2012).
18. Krupnick, J.G., Santini, F., Gagnon, A.W., Keen, J.H., & Benovic, J.L. Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J. Biol. Chem.* **272**, 32507-32512 (1997).
19. Orsini, M.J. & Benovic, J.L. Characterization of dominant negative arrestins that inhibit beta2-adrenergic receptor internalization by distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* **273**, 34616-34622 (1998).
20. Charest, P.G., Oligny-Longpre, G., Bonin, H., Azzi, M., & Bouvier, M. The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cell Signal.* **19**, 32-41 (2007).
21. Sonoda, N. *et al.* Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 6614-6619 (2008).
22. Mundell, S.J., Loudon, R.P., & Benovic, J.L. Characterization of G protein-coupled receptor regulation in antisense mRNA-expressing cells with reduced arrestin levels. *Biochemistry* **38**, 8723-8732 (1999).

23. Kohout,T.A., Lin,F.S., Perry,S.J., Conner,D.A., & Lefkowitz,R.J. beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 1601-1606 (2001).
24. Azzi,M. *et al.* Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 11406-11411 (2003).
25. Bryja,V., Gradl,D., Schambony,A., Arenas,E., & Schulte,G. Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 6690-6695 (2007).
26. Han,M., Gurevich,V.V., Vishnivetskiy,S.A., Sigler,P.B., & Schubert,C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure*. **9**, 869-880 (2001).
27. Zhan,X., Gimenez,L.E., Gurevich,V.V., & Spiller,B.W. Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J. Mol. Biol.* **406**, 467-478 (2011).
28. Xiao,K., Shenoy,S.K., Nobles,K., & Lefkowitz,R.J. Activation-dependent conformational changes in beta-arrestin 2. *J. Biol. Chem.* **279**, 55744-55753 (2004).
29. Nobles,K.N., Guan,Z., Xiao,K., Oas,T.G., & Lefkowitz,R.J. The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins1 and -2. *J. Biol. Chem.* **282**, 21370-21381 (2007).
30. Shukla,A.K. *et al.* Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* **497**, 137-141 (2013).
31. Schmid,E.M. *et al.* Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS. Biol.* **4**, e262 (2006).
32. Singh,S.N., Bakshi,K., Mercier,R.W., Makriyannis,A., & Pavlopoulos,S. Binding between a distal C-terminus fragment of cannabinoid receptor 1 and arrestin-2. *Biochemistry* **50**, 2223-2234 (2011).
33. Kisselev,O.G., Downs,M.A., McDowell,J.H., & Hargrave,P.A. Conformational changes in the phosphorylated C-terminal domain of rhodopsin during rhodopsin arrestin interactions. *J. Biol. Chem.* **279**, 51203-51207 (2004).

34. Milano,S.K., Pace,H.C., Kim,Y.M., Brenner,C., & Benovic,J.L. Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* **41**, 3321-3328 (2002).
35. Angers,S. *et al.* Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 3684-3689 (2000).
36. Hamdan,F.F., Audet,M., Garneau,P., Pelletier,J., & Bouvier,M. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J. Biomol. Screen.* **10**, 463-475 (2005).
37. Chen,Z., Dupre,D.J., Le,G.C., Rola-Pleszczynski,M., & Stankova,J. Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. Role of the C terminus and the (D/N)PXXY motif. *J. Biol. Chem.* **277**, 7356-7362 (2002).
38. Feierler,J. *et al.* Helix 8 plays a crucial role in bradykinin B(2) receptor trafficking and signaling. *J. Biol. Chem.* **286**, 43282-43293 (2011).
39. Celver,J., Vishnivetskiy,S.A., Chavkin,C., & Gurevich,V.V. Conservation of the phosphate-sensitive elements in the arrestin family of proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 9043-9048 (2002).
40. Zimmerman,B. *et al.* Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci. Signal.* **5**, ra33 (2012).
41. Aguila,B., Simaan,M., & Laporte,S.A. Study of G protein-coupled receptor/beta-arrestin interactions within endosomes using FRAP. *Methods Mol. Biol.* **756**, 371-380 (2011).
42. Gousseva,V., Simaan,M., Laporte,S.A., & Swain,P.S. Inferring the lifetime of endosomal protein complexes by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* **94**, 679-687 (2008).
43. Kim,Y.J. *et al.* Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature* **497**, 142-146 (2013).
44. Wu,Y. *et al.* The Arf GAP AGAP2 interacts with beta-arrestin2 and regulates beta2-adrenergic receptor recycling and ERK activation. *Biochem. J.* **452**, 411-421 (2013).

45. Notredame,C., Higgins,D.G., & Heringa,J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**, 205-217 (2000).
46. Lavoie,C. *et al.* Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J. Biol. Chem.* **277**, 35402-35410 (2002).
47. Simaan,M., Bedard-Goulet,S., Fessart,D., Gratton,J.P., & Laporte,S.A. Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization. *Cell Signal.* **17**, 1074-1083 (2005).
48. Goupil,E. *et al.* A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 25624-25636 (2010).
49. Leduc,M. *et al.* Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**, 297-307 (2009).

Supplementary Informations

Supplementary Figure 1. Modulation of V2R cell surface expression by candidates in the absence of AVP stimulation. FACS measurement of HA-V2R-venus cell surface expression on the same cells as **Figure 2,a,b,c** following stimulation with vehicle (-), the indicated compounds (100 μ M, 30 min) or AVP (100 nM, 20 min). The extent of endocytosis was determined relative to the AVP- and vehicle-stimulated samples as already described (see methods section). Data represent the mean \pm s.e.m. of 3 independent experiments. Significance was determined using ANOVA followed by Bonferroni's test against vehicle-treated cells (***) $P < 0.001$).

Supplementary Figure 2. Candidate spectroscopic interference with luminescence signal. Luminescence ratio detected from cells stably expressing *RLuc* and treated (50 min) with vehicle (-), AVP (100 nM) or the indicated compounds (100 μ M). Data represent the mean \pm S.E.M. of six independent experiments. '*' indicates deviation of the luminescence ratio outside the limit of ± 5 times the standard deviation of vehicle-treated cells.

Supplementary Figure 3. Compound 57 activity against AVP binding to V2R. [³H]AVP radioligand binding assay on membrane preparation from the same cells as **Figure 2a,b,c**. Membranes were pre-incubated (10 min) with vehicle or the indicated concentration of compound 57 followed by [³H]AVP incubation. Non-specific binding was determined by adding the V2R antagonist SR121463 (10 μ M) to the samples at a concentration that displace 99.9 % of AVP binding to the receptor and was subtracted from the total binding obtained for each sample to obtain the specific binding. HA-V2R-venus expression was determined to be 1.73 ± 0.67 pmol of receptor / mg of membrane protein and corresponds 17 % of [³H]AVP total binding. Data represent the mean \pm s.e.m of at least 3 independent experiments. Significant difference between total binding in all samples against non-specific binding was found using ANOVA followed by a Dunnett's test ($P < 0.05$).

Supplementary Figure 4. Compound 57c ability to modulate β arr2 recruitment to V2R and affect endosomal β arr2/V2R complex. (a) Assay as described in **Figure 3d**, but using compound 57c. (b) Assay as described in **Figure 6b,c**, but using compound 57c. (c) Calculated half-life measured in vehicle- and compound 57c-treated samples. Compound 57c is cyclopentyl 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-3-quinolinecarboxylate. Data are the mean \pm s.e.m. of at least 3 independent experiments for 17-20 endosomes. Significance was determined using two-tailed unpaired student t-test (ns = non-significant).

Supplementary Figure 5. Model of UM0012685 mode of action on β arr. Hormone binding to a GPCR activates G protein signaling, resulting in G protein-coupled receptor kinases-mediated phosphorylation of the receptor inner domains. This triggers β arr recruitment and conformational changes that lead to its activation. UM0012685 is thought to stabilize the inactive basal state by competing directly with the receptor C-terminal tail, stabilizing a β arr C-tail position competing with receptor C-tail and a lariat loop conformation that disengages residues coordinating receptor C-tail phosphates. Black arrows indicate important structure element and residues. Dotted lines indicate residues interaction.

Supplementary methods

Membrane Preparation and Radioligand Binding Assay. HEK293 cells were mechanically lysed in hypotonic buffer (25 mM Tris, 2 mM EDTA and protease inhibitor pH 7.4) and centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C to get rid of the nuclei and cell debris. Supernatants were then centrifuged at 40,000 x g for 20 min at 4°C and the pelleted membranes washed twice in the same buffer prior to determining protein concentration using DCtm protein assay. Thirty or 100 µg of membrane proteins were then incubated in binding buffer (75 mM Tris, MgCl₂ 12.5 mM, 2 mM EDTA and protease inhibitor pH 7.4) with 100 nM of V2R agonist [³H]AVP in the presence of vehicle or indicated compounds for 90 min at room temperature. The binding reaction was stopped by rapid filtration of the membranes on GF/C fiber glass filters, separating free from bound [³H]AVP. Residual radioactivity on the filters was determined using scintillation counting.

Figure 1

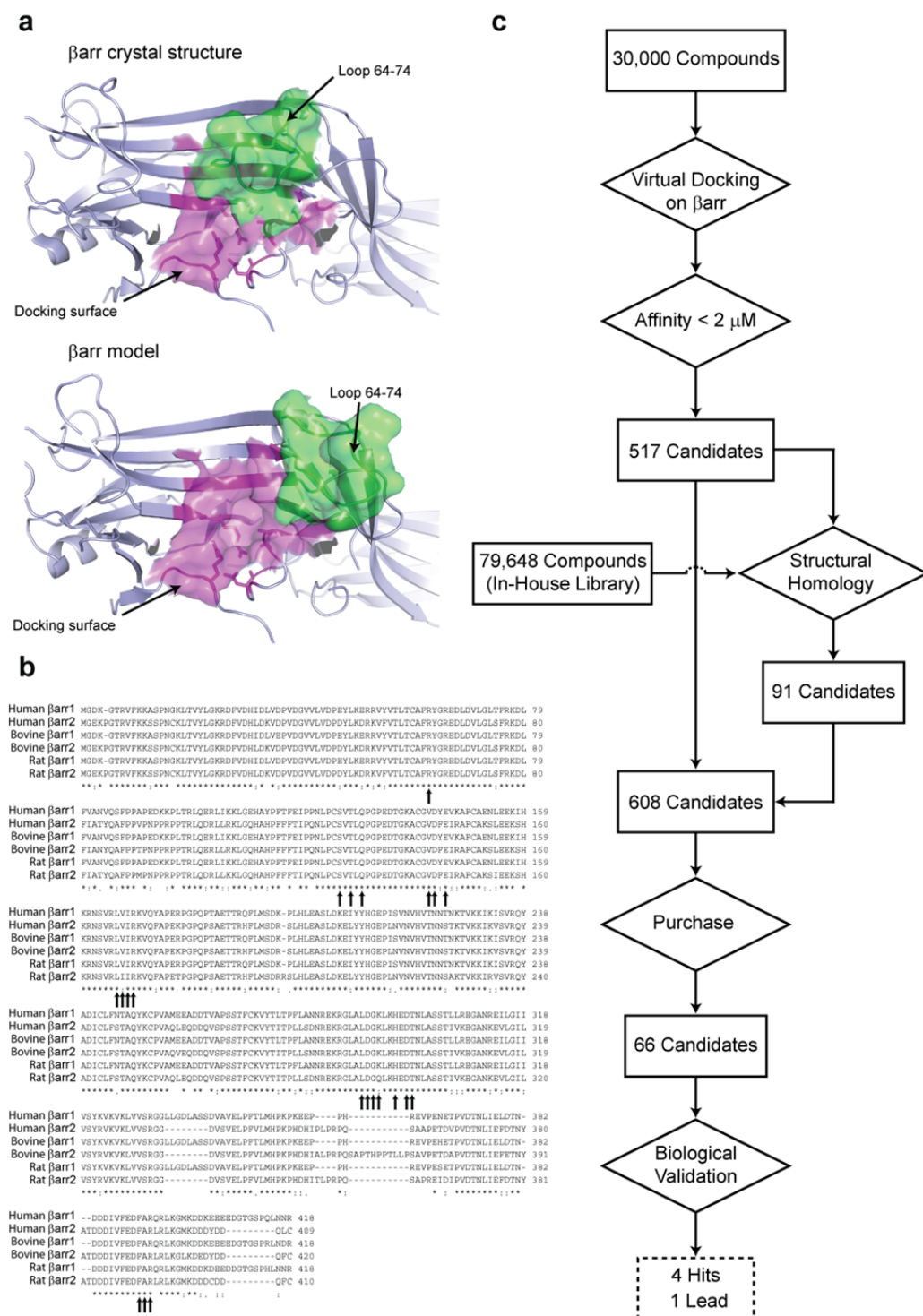


Figure 2

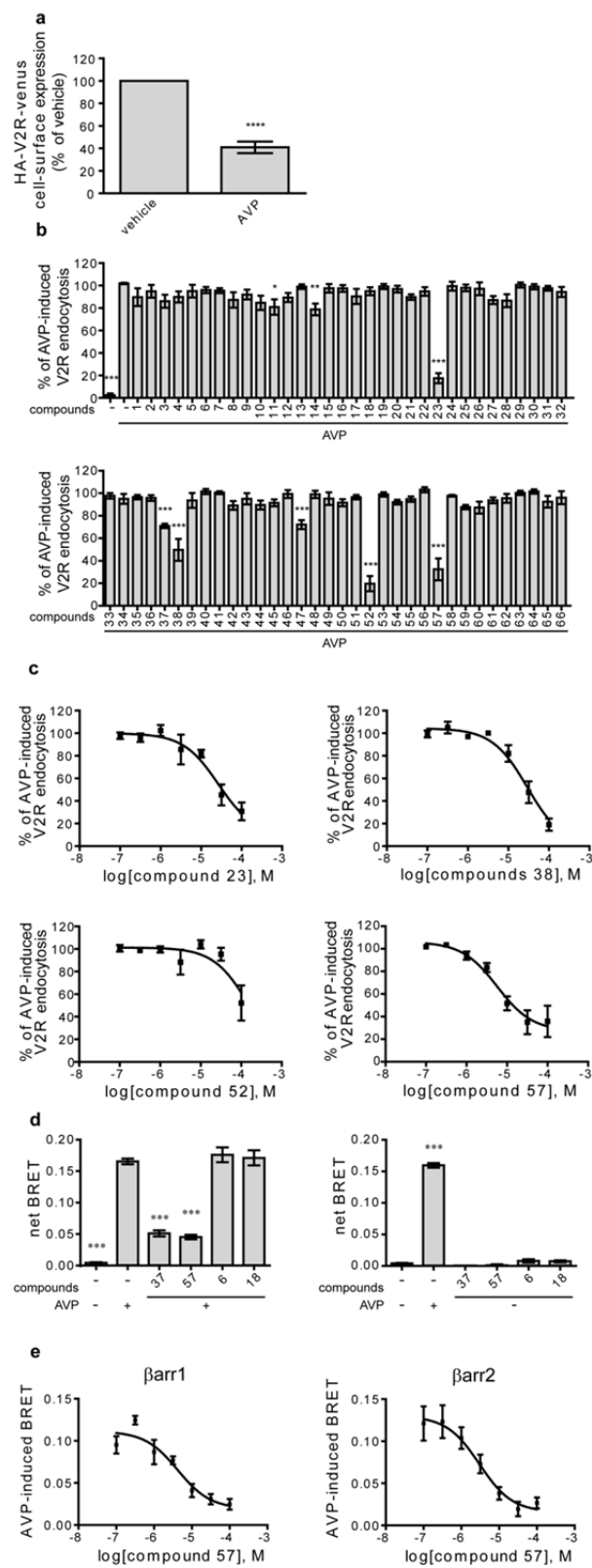


Figure 3

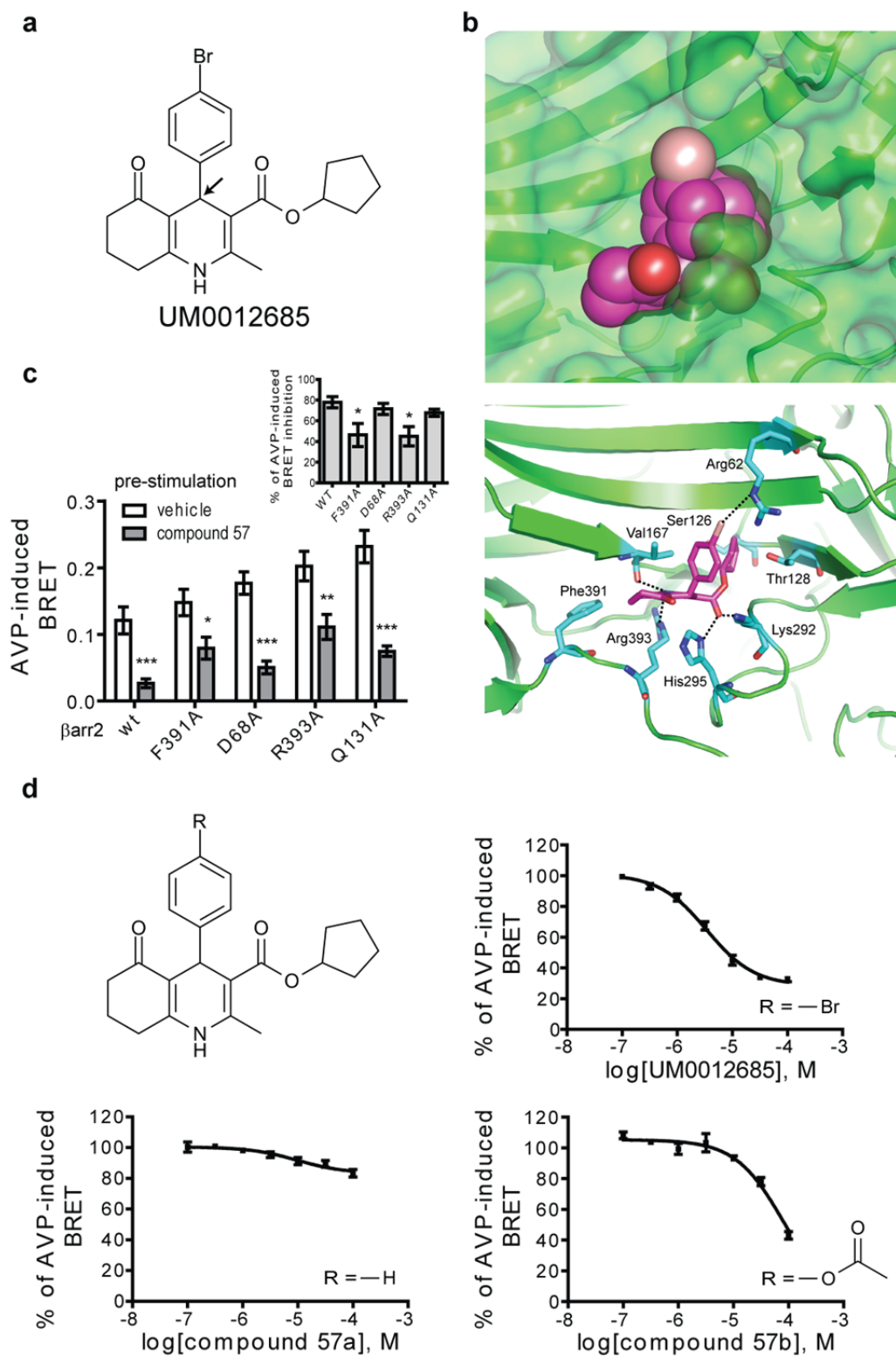


Figure 4

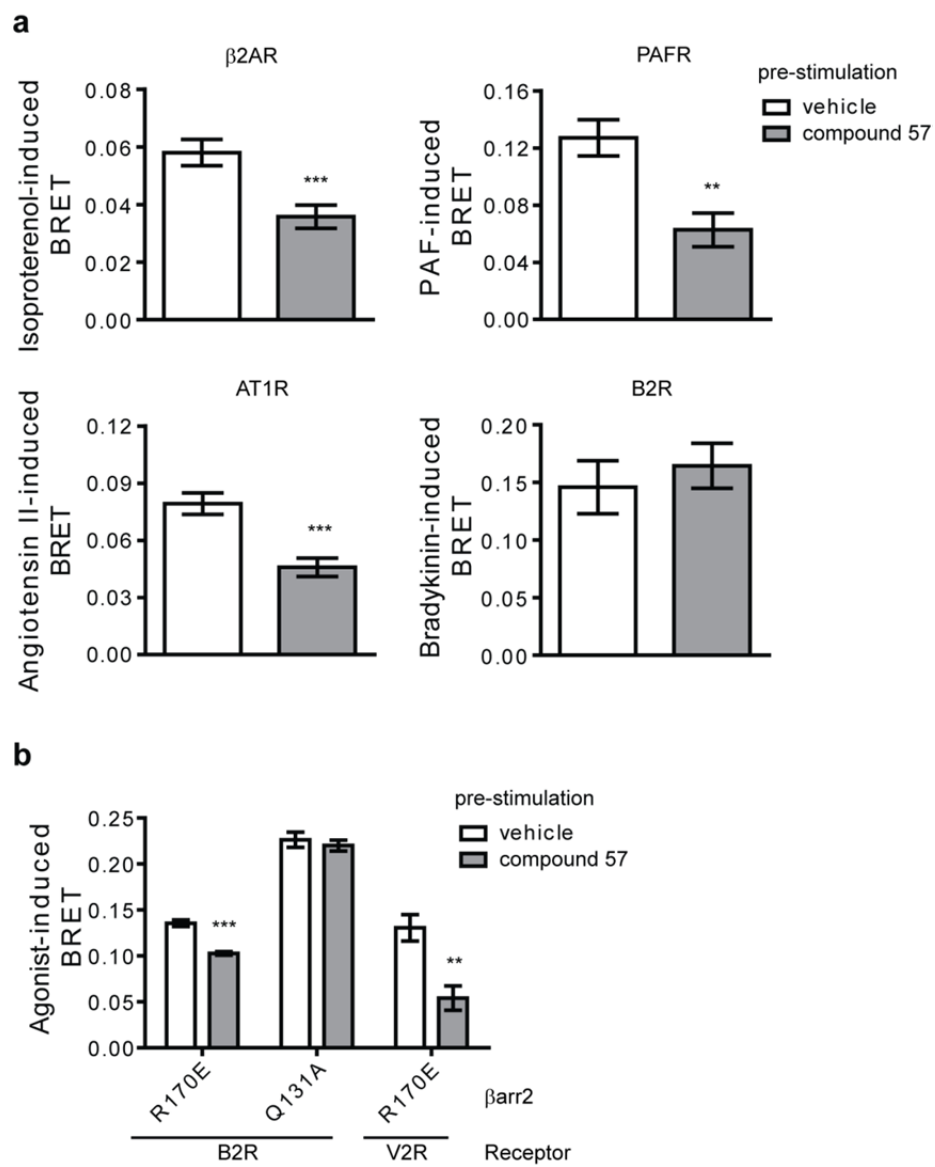


Figure 5

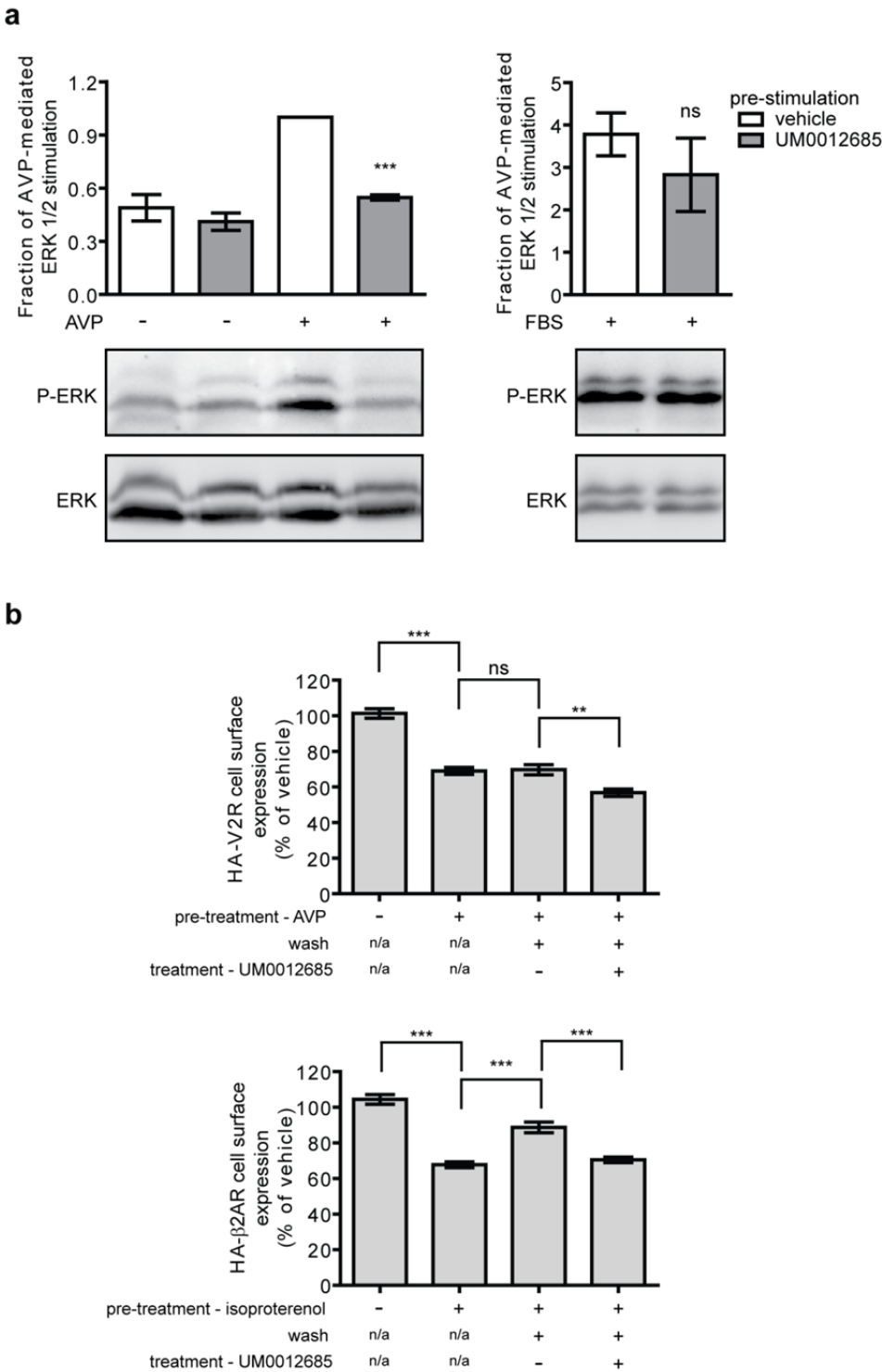
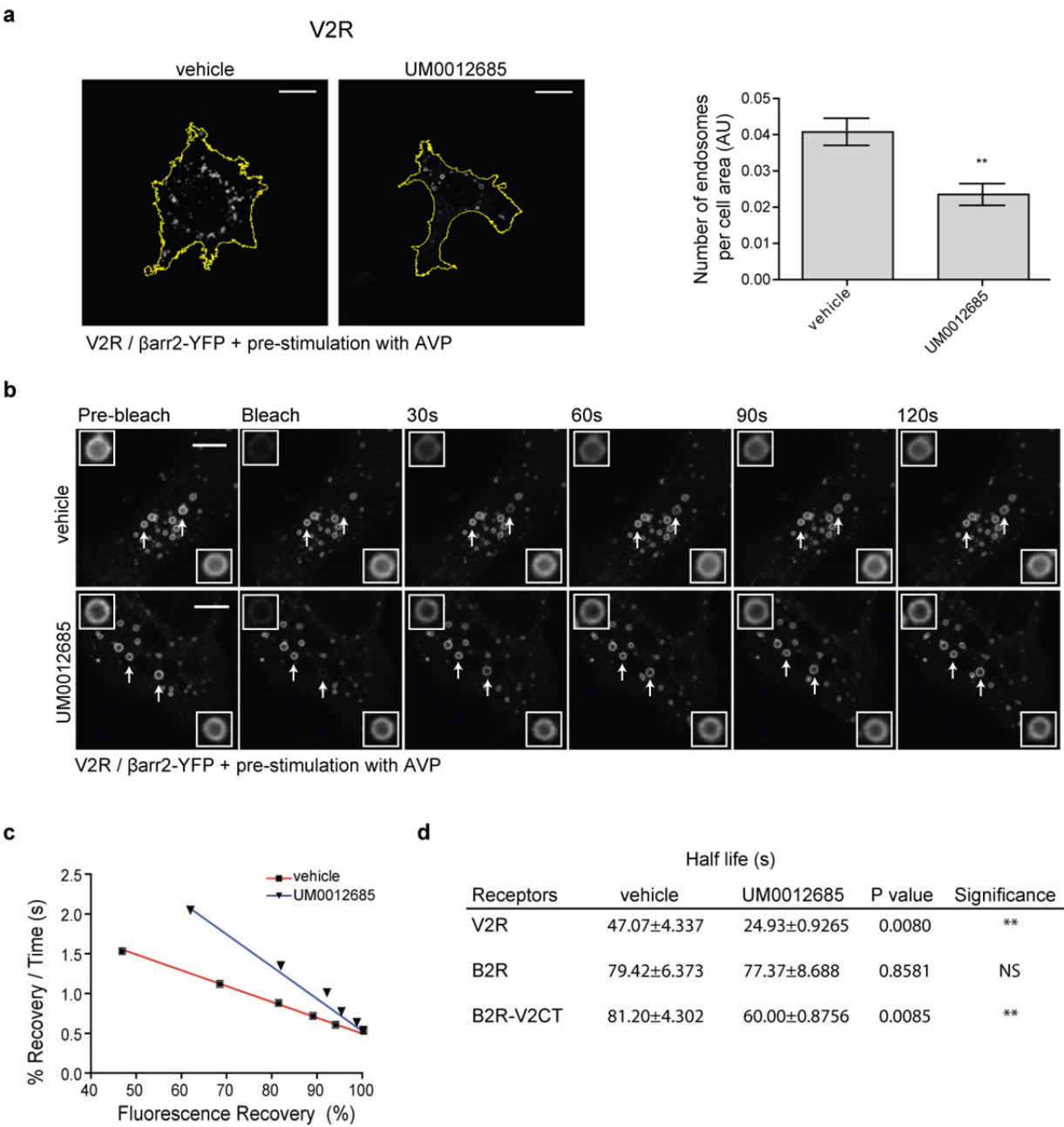
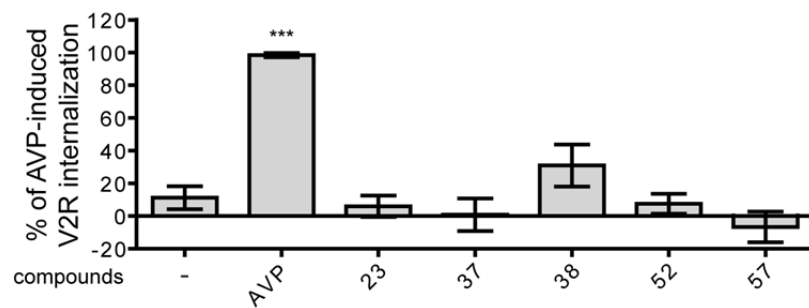


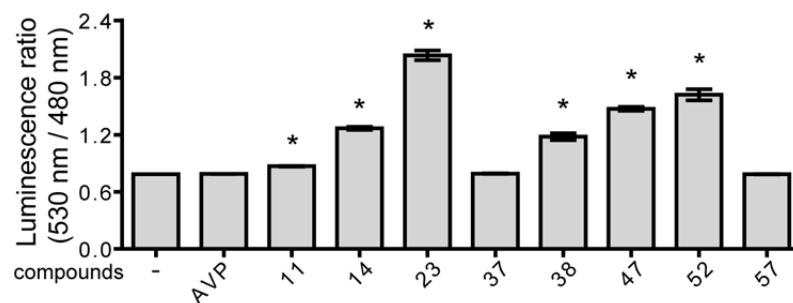
Figure 6



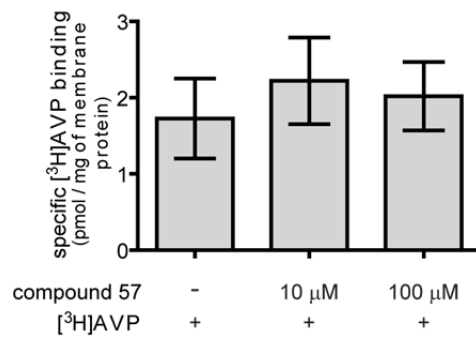
Supplementary figure 1



Supplementary figure 2

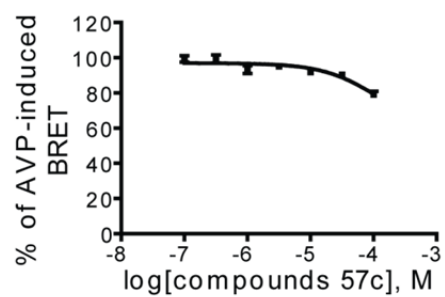


Supplementary figure 3

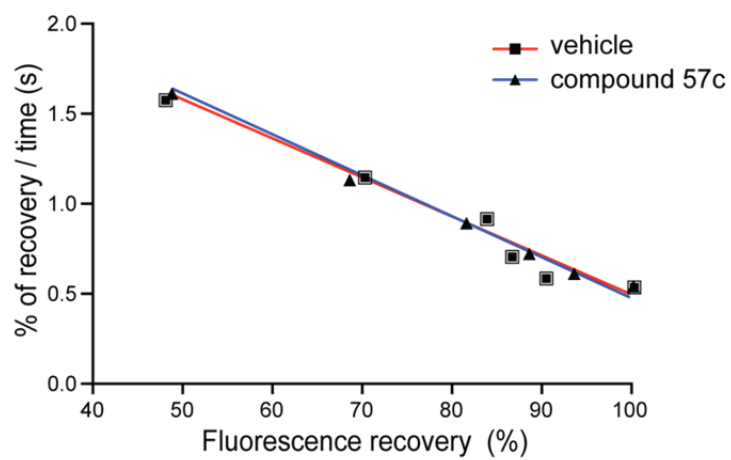


Supplementary figure 4

a



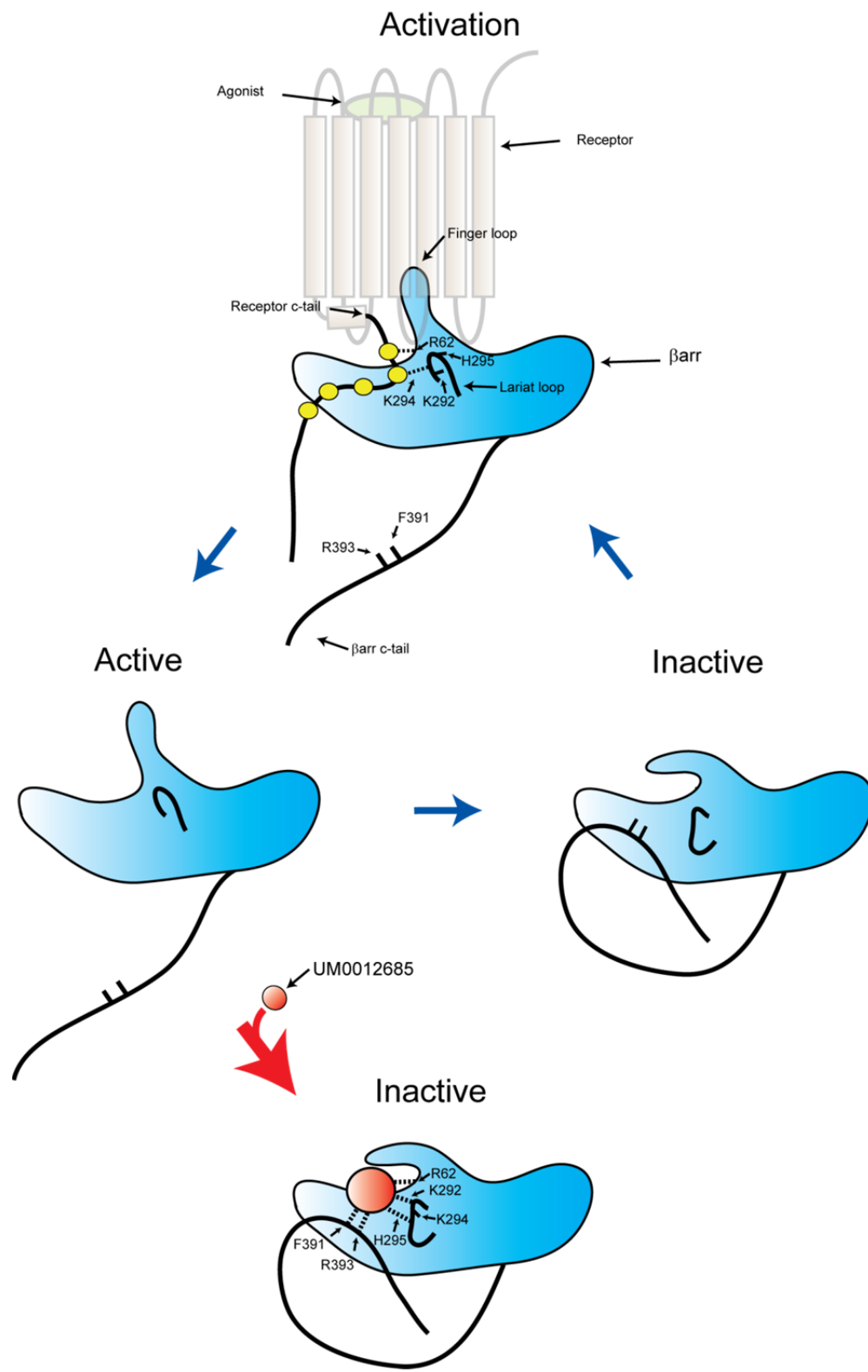
b



c

Half life (s)	vehicle	compound 57c	P value	Significance
V2R	45.16±1.184	48.85±1.914	0.1997	ns

Supplementary Figure 5



Discussion

Retour sur les déterminants moléculaires de l'efficacité du β 2AR et des β -bloqueurs

Cette thèse s'est déroulée dans le contexte de changements profonds dans la compréhension des RCPGs catalysés par le développement de nouvelles technologies dans le domaine de la génomique, de la protéomique, du criblage haut débit et en biologie structurale qui ont permis notamment d'énumérer la liste complète des récepteurs chez les mammifères, d'élargir la liste de leurs effecteurs, d'augmenter le nombre de ligands disponibles et d'offrir une description de la structure de certains RCPGs liant les ligands diffusibles à une résolution atomique. Grâce à ces nouveaux outils qui ont généré des données qui souvent défient les anciens concepts de la pharmacologie, le modèle de la transduction du signal d'un ligand a évolué de l'activation linéaire d'une protéine G hétérotrimérique et d'une voie de signalisation par un récepteur, à l'acceptation générale qu'un récepteur peut adopter plusieurs conformations induites par différents ligands, menant à l'engagement de différents effecteurs et à l'activation de différentes voies de signalisation. Ainsi, chaque ligand induit un biais dans la modulation des voies de signalisation en activant ou inhibant un sous-ensemble de voies de manière distincte. Cependant, les déterminants de la structure moléculaire des ligands et récepteurs impliqués dans le biais de la signalisation sont encore mal connus, sauf pour les quelques ligands de l'AT1R et du PTHR (Wei et al., 2003; Rajagopal et al., 2006; Gesty-Palmer et al., 2006). De manière intéressante, ces deux récepteurs peuvent lier des peptides modifiés qui activent sélectivement les MAPK de manière dépendante des β arrs. Cependant, en l'absence de structure cristalline de ces complexes ligand/récepteur, il n'existe aucune information sur la façon dont ces ligands induisent une signalisation sélective sur ces récepteurs. Toutefois, ces ligands ont des propriétés physiologiques qui se distinguent des hormones naturelles, indiquant que la connaissance du rôle de chaque voie de signalisation dans un événement physiologique ou pathophysiologique pourrait aider à prédire l'efficacité des ligands *in vivo*. Inversement, les ligands biaisés induisant une signalisation sélective pourraient servir d'outil pharmacologique pour déterminer le rôle physiologique d'une voie activée par récepteur.

Dans ce contexte, la compréhension des déterminants moléculaires guidant les changements conformationnels des récepteurs associés à l'engagement des différents effecteurs comme les protéines G hétérotrimériques et les β arrs permettra d'élaborer de nouvelles stratégies de conception de médicaments plus performantes. À ce titre, la résolution en 2007 de la structure du β 2AR liée au carazolol, la première structure cristalline d'un RCPG liant des ligands diffusibles et les 58 autres structures qui ont suivi à ce jour, incluant des complexes avec des agonistes, antagonistes et agonistes inverses de la voie des protéines G hétérotrimériques ainsi qu'avec la protéine G hétérotrimérique $G_{\alpha_s}\beta_1\gamma_2$, ont ouvert la voie à une meilleure compréhension des mécanismes de transduction du signal des RCPG. À ce titre, l'article 1 de cette thèse émet quelques hypothèses à partir d'observations de la structure cristalline du β 2AR liée au carazolol. Parmi ces dernières, alors que quelques-unes ont été abordées expérimentalement par moi-même, d'autres sont poursuivies actuellement au laboratoire et formeront la base d'un manuscrit qui sera soumis plus tard. D'abord, les études de mutagenèse du β 2AR et la structure cristalline en forme inactive de la rhodopsine suggèrent la présence d'une serrure ionique, un lien électrostatique entre les résidus R131 et E268 du β 2AR. Cet élément structural maintiendrait le TM3 à proximité du TM6 empêchant l'ouverture de la cavité de couplage des protéines G hétérotrimériques sur le récepteur, ce qui maintiendrait le récepteur inactif dans la voie de l'AC (Audet and Bouvier, 2012)(figure 3 de l'article 1, page 107 de la section résultats)(annexe 2, page iii de la section annexe). Or, cette interaction n'est pas présente dans la structure publiée du β 2AR (Rosenbaum et al., 2007) et ce malgré l'efficacité agoniste inverse du carazolol dans la voie de l'AC. Alternativement, la Y141 de la deuxième boucle intracellulaire, un résidu impliqué dans le contrôle de l'activité du récepteur (Valiquette et al., 1995; Hadcock et al., 1992), s'intercale entre les résidus de la serrure ionique et interagit avec le résidu R131 et le TM6, suggérant un nouveau mécanisme de stabilisation de la conformation inactive du récepteur, induit par les agonistes inverses, se substituant à la serrure ionique (figure 3 de l'article 1, page 107 de la section résultats).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons muté la Y141 en alanine pour déstabiliser les interactions responsables de l'intercalation de ce résidu dans la serrure ionique. Nous avons prédit que si l'efficacité inverse agoniste du carazolol sur la voie de l'AC est la conséquence de la stabilisation de la position de la Y141 malgré l'ouverture de la serrure ionique, alors en

l'absence de la Y141 le carazolol devrait agir maintenant comme un agoniste partiel sur le récepteur (article 1, page 86 de la section résultats). Malheureusement, la mutation de la Y141 en alanine ou en phénylalanine ne transforme pas l'efficacité du carazolol en agoniste partiel sur la voie de l'AC ni un autre agoniste inverse, le nebivolol, indiquant que ce résidu ne contribue pas à l'efficacité agoniste inverse des ligands du β 2AR (figure 19, page 210 de la section discussion). De plus, aucune différence dans l'activité basale entre le récepteur de type sauvage et les mutants n'a été détectée suggérant que la Y141 n'est pas non plus impliquée dans le contrôle de l'activité basale du récepteur (résultat non montré). Cependant, il est aussi possible que plusieurs états inactifs du β 2AR existent et qu'en l'absence de la tyrosine, la serrure ionique R131-E268 puisse se former et ainsi stabiliser le récepteur. Une structure cristalline du β 2AR avec le résidu Y141 mutée en alanine pourrait permettre de voir s'il y a formation de la serrure ionique R131-E268 dans ce récepteur.

Toutefois, la résolution des structures de plusieurs autres récepteurs liés à des antagonistes et agonistes inverses a montré que la formation de la serrure ionique n'était pas aussi importante qu'anticipée dans la stabilisation d'une conformation inactive du β 2AR. Par exemple, le β 1AR, dont la séquence de la BI2 est très homologue avec celle du β 2AR, possède une conformation alternative en hélice α qui repositionne la Y141 en dehors d'une position d'interférence avec la serrure ionique (figure 20, page 211 de la section discussion). Malgré cette configuration alternative, la serrure ionique n'est pas présente dans les structures du β 1AR indiquant que la Y141 n'agit pas comme un inhibiteur de sa formation. En fait, seule une minorité de structures de RCPG liée à des antagonistes ou des agonistes inverses arborent une serrure ionique, en accord avec l'existence de multiples conformations inactives de récepteur, sans toutefois discréditer la participation de ce motif structural dans la stabilisation d'états inactifs. De plus, la position alternative de la Y141 est aussi retrouvée dans les structures du β 2AR en conformation active publiées après la publication de l'article 1. Le repliement similaire de la Y141 dans des récepteurs en conformations active et inactive suggère que ce résidu n'est pas un déterminant direct de l'activité du β 2AR. Par contre, les interactions abondantes de la Y141 avec des résidus importants pour le maintien du β 2AR dans un état inactif comme la R131 est en accord avec le rôle de la phosphorylation de la Y141 dans la modulation de l'activité du récepteur. En effet, il a été montré que la

phosphorylation de la Y141 suite à la stimulation de cellules par l'insuline augmente la réponse du β 2AR activé par un agoniste sur la voie de l'AC (Valiquette et al., 1995). Dans ce cas, la phosphorylation de la tyrosine pourrait déstabiliser sa position intercalante inhibitrice dans la structure pour favoriser l'activation du récepteur par un agoniste. Il serait intéressant de vérifier si la pré-stimulation de cellules par l'insuline, et non la mutation de la Y141, pourrait transformer le carazolol en agoniste partiel.

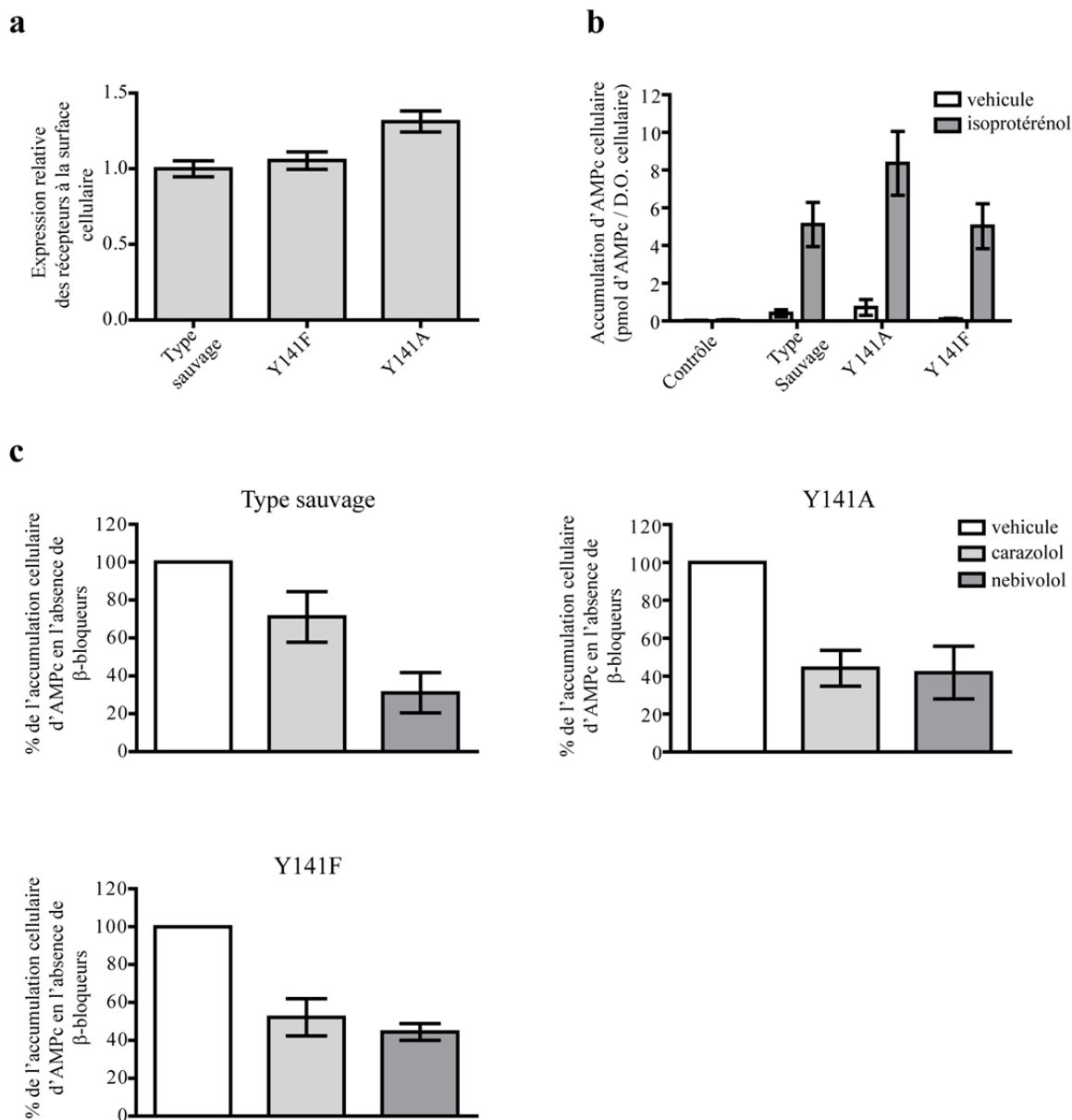


Figure 19. Activité de certains β-bloqueurs sur la voie de l'AC avec les récepteurs β2AR de type sauvage, Y141F et Y141A. a) Expression de surface relative mesurée par ELISA des récepteurs HA-β2AR de type sauvage et mutants Y141F, Y141A, dans des cellules HEK293 exprimant de manière stable ces récepteurs. Les protocoles d'ELISA et de génération des lignées exprimant de manière stable les récepteurs β2AR ont déjà été décrits (article 4, page 166 de la section résultats et annexe 5, page vi de la section annexe, respectivement)(Stallaert et al., 2012). La densité de récepteur β2AR dans les cellules exprimant le type sauvage est de 1.076 ± 0.14 pmol de récepteur par mg de protéine membranaire (annexe 5, page vi de la

section annexe)(Stallaert et al., 2012). b) Accumulation d'AMPc par les cellules non transfectées (contrôle) ou qui expriment de façon stable les récepteurs induites ou non par la stimulation avec 1 μ M d'isoprotérénol. c) Efficacité du carazolol et du nébivolol dans la voie de l'AC. Les cellules stables sont stimulées simultanément par 300 nM forskoline et 10 μ M antagonistes. Tous les traitements pharmacologiques sont effectués pendant 30 minutes à 37°C. L'accumulation d'AMPc est mesurée à l'aide de la trousse de lecture d'AMPc, HTRF cAMP dynamic 2 (CisBio). Les résultats sont la moyenne \pm la déviation standard sur la moyenne de 1 à 3 expériences indépendantes.

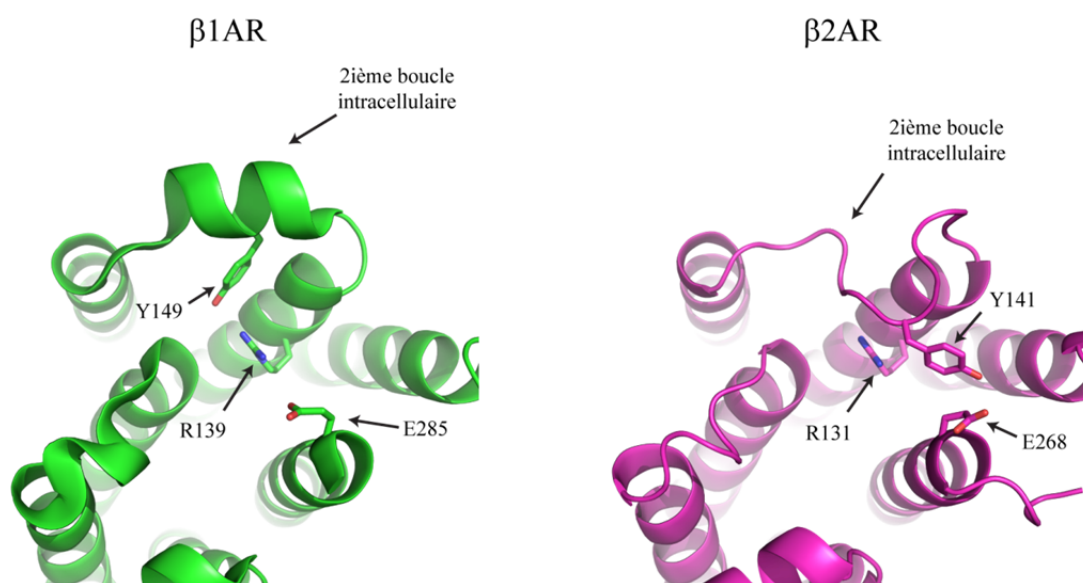


Figure 20. Comparaison de la position des résidus analogues Y149 (β 1AR) et Y141 (β 2AR) dans les structures cristallines en conformation inactive. Représentation en ruban des récepteurs β 1AR (pdbid: 2vt4, panneau de droite) et β 2AR (pdbid: 2rh1, panneau de gauche), vu de dessous. Les résidus R139, Y149 et E285 du β 1AR ainsi que R131, Y141 et E268 du β 2AR sont représentés en bâton et indiqués par des flèches.

En tenant compte de leur efficacité à moduler les voies de l'AC et des MAPK par l'intermédiaire du β 2AR, les β -bloqueurs peuvent être classés en 3 groupes distincts (agoniste inverse sur AC, agoniste MAPK; antagoniste neutre sur AC, agoniste MAPK; agonistes

inverses sur la voie AC et MAPK)(Galandrin and Bouvier, 2006). La publication de la structure du β 2AR lié au carazolol, un agoniste inverse sur la voie de l'AC dont l'activité sur les MAPK était inconnue à l'époque, a offert pour la première fois l'opportunité d'examiner la relation entre le mode de liaison des β -bloqueurs sur ce récepteur et leur efficacité. À cette fin, nous avons prédit leur mode de liaison en utilisant l'arrimage moléculaire virtuelle sur les coordonnées de la structure du β 2AR en l'absence de carazolol (article 1, page 86 de la section résultats). L'arrimage moléculaire virtuel reproduit généralement fidèlement les modes de liaison des ligands sur les structures cristallines si la cible est dans un état similaire à celle retrouvée dans le cristal. À ce titre, les structures du récepteur β 2AR liées à différents β -bloqueurs publiées après l'article 1 sont très semblables à la structure du β 2AR lié au carazolol (Audet and Bouvier, 2012)(annexe 2, page iii de la section annexe). Ainsi, sans surprise, nous avons non seulement prédit assez bien la position du carazolol par rapport à sa structure cristalline avec le β 2AR (article 1, page 86 de la section résultats), mais aussi celle de l'alprénolol et de l'ICI-118551 (pdbid: 3ny8) par rapport à leur structure cristalline avec le β 2AR (pdbid: 3nya et 3ny8 respectivement), avec des RMSD de 0.474 Å et 1.2 Å, et ce avant la publication de ces structures validant la nature prédictive de l'arrimage moléculaire.

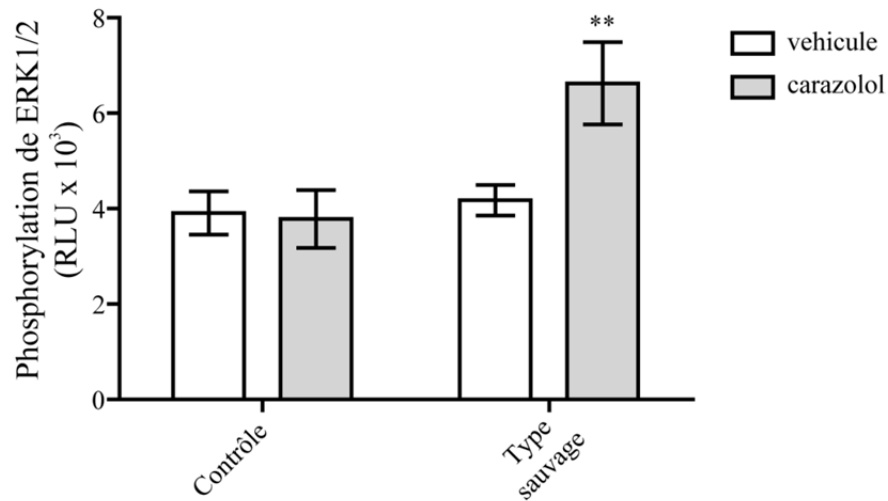
Les résultats de l'article 1 montrent que les ligands d'un groupe partageant des patrons similaires de signalisation se lient de manière similaire alors que des écarts plus importants dans les modes de liaison sont observés entre les ligands de groupe de patrons de signalisation distinct, suggérant que le mode de liaison des β -bloqueurs sur le β 2AR pourrait refléter leur efficacité, au moins sur les voies de l'AC et des MAPK. En accord avec cette hypothèse, nous avons pu confirmer que le carazolol, qui se lie sur le β 2AR de la même manière que les ligands agonistes inverses AC / agoniste MAPK, est aussi un agoniste MAPK (figure 21, page 215 de la section discussion). De plus, grâce à ces expériences, nous avons pu proposer que le mode de liaison prédit des ligands agonistes inverses sur les voies de l'AC et des MAPK se distinguait des autres groupes en liant le β 2AR à la verticale grâce à des interactions plus importantes avec la BE2. Malheureusement, cette hypothèse n'a pas été testée expérimentalement à ce jour et n'a pas non plus été confirmée depuis par une structure cristalline. Cependant, bien que ce type de liaison était plutôt inusité pour l'époque car la plupart des modèles de récepteurs dérivés de la rhodopsine suggéraient un mode de liaison des

ligands RCPG à l'horizontale, la liaison verticale de ligands avec une forte contribution des BE, dont la deuxième boucle, est maintenant observée dans des structures cristallines pour d'autres couples récepteurs / ligands comme le récepteur A2AR lié à l'antagoniste ZM241385 (Audet and Bouvier, 2012)(figure 3 de l'annexe 2, page iii de la section annexe). Les ligands du groupe agoniste inverse AC et MAPK comme le métoprolol, le bisoprolol et l'aténolol, sont des β -bloqueurs possédant une sélectivité pour le β 1AR (par rapport au β 2AR) conférée par le branchement d'une fonction chimique en para du groupement aryloxy (Baker, 2005; Basil et al., 1976; Ablad et al., 1973; Barrett et al., 1973; Machin et al., 1983) (figure 22, page 216 de la section discussion). Selon notre modèle, la substitution en para du groupement aryl est stériquement contrainte par le TM5 ce qui force ce type de ligand à se positionner de manière parallèle au TM5 (à la verticale). Dans tous les cas, la fonction propanolamine, retrouvée dans presque tous les β -bloqueurs et qui interagit normalement avec les résidus D113 et N312 du β 2AR, se repositionne maintenant à proximité des boucles extracellulaires du β 2AR (figure 4 de l'article 1, page 108 de la section résultats). De manière intéressante, les résidus des TMs situés dans le site de liaison du β 1AR et du β 2AR sont très conservés et la majeure partie des variations de séquence se situe dans les BEs. Ainsi, il est très probable que la sélectivité de liaison de ces ligands proviennent de résidus localisés sur les boucles (Frielle et al., 1988; Rosenbaum et al., 2007; Warne et al., 2008) et certains résidus comme la K305 de la BE3 du β 2AR a déjà été suggérée comme médiateur de la sélectivité de certains nouveaux agonistes de ce récepteur (Hoenke et al., 2009). De plus, en accord avec l'importance de la BE3 dans la liaison des β -bloqueurs, une étude de simulation par dynamique moléculaire de l'arrimage de l'alprénolol sur le β 2AR propose un mécanisme de liaison en plusieurs étapes dont les BE2 et BE3 du récepteur constituent la porte d'entrée principale pour l'acheminement du β -bloqueur au site de liaison classique (Dror et al., 2011).

Des simulations similaires à ceux de l'article 1, mais utilisant comme cible un modèle du β 1AR humain dérivé de la structure du β 2AR et dont la conformation est très proche de la structure cristalline du β 1AR de dinde (RMDS sur les carbones β de 0.6 Å), suggère que le mode de liaison de l'aténolol, du métoprolol et du bisoprolol (figure 23, page 217 de la section discussion) est similaire à celui sur le β 2AR, c'est à dire vertical. Toutefois, il y a quelques différences notables surtout pour le bisoprolol et le métoprolol. De manière intéressante, le

groupement propanolamine de ces ligands interagit avec le résidu D356 de la BE3 du β 1AR humain, mais pas avec le résidu K305 situé à la position homologue dans le β 2AR, suggérant que l'orientation verticale de ces composés positionnerait le groupement propanolamine vers des déterminants de sélectivité de liaison des récepteurs β -adrénergiques. Pour sa part, l'importance de la BE3 du β 1AR dans la liaison de ces ligands pourrait expliquer la différence dans la simulation du mode de liaison de l'aténolol sur le β 1AR, un ligand qui possède une plus faible affinité pour les β -adrénergiques que le métoprolol et le bisoprolol. Afin de confirmer cette hypothèse, des structures cristallines des β 1AR et β 2AR liés aux ligands possédant une fonction branchée en para sur le groupement aryloxy devront être résolues. Considérant que pour le récepteur β 1AR, ces ligands sont aussi des agonistes inverses de la voie de l'AC mais plutôt des agonistes partiels de la voie des MAPK, l'analyse des résidus participant à la sélectivité de liaison, principalement dans la région de la BE3, pourrait aussi aider à comprendre les mécanismes de l'efficacité des récepteurs β 1- et β 2-adrénergique.

a



b

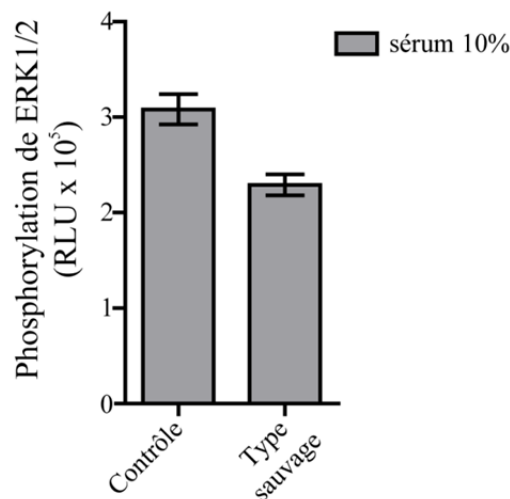


Figure 21. Efficacité du carazolol sur la voie des MAPK. La phosphorylation de ERK1/2 est mesurée par la trousse de détection SureFire (Perkin Elmer) suite à la stimulation ou non par a) 10 μ M de carazolol (5 minutes à 37°C) ou b) 10 % de sérum fœtal bovin (2 minutes à 37°C) des cellules non transfecté (contrôle) ou exprimant de manière stable le β 2AR (figure 19, page 210 de la section discussion). Le sérum fœtal bovin est un contrôle positif de l'activation de ERK1/2 dans les cellules utilisées dans cette expérience. Les résultats sont la moyenne \pm la déviation standard sur la moyenne de 3 à 8 expériences indépendantes. La significativité statistique du signal obtenu après la stimulation par le carazolol vs le signal obtenu après la stimulation avec le vehicule des cellules exprimant de manière stable le β 2AR

a été déterminée par un test de student contre le signal obtenu dans la condition de stimulation par le véhicule (** $P < 0.01$).

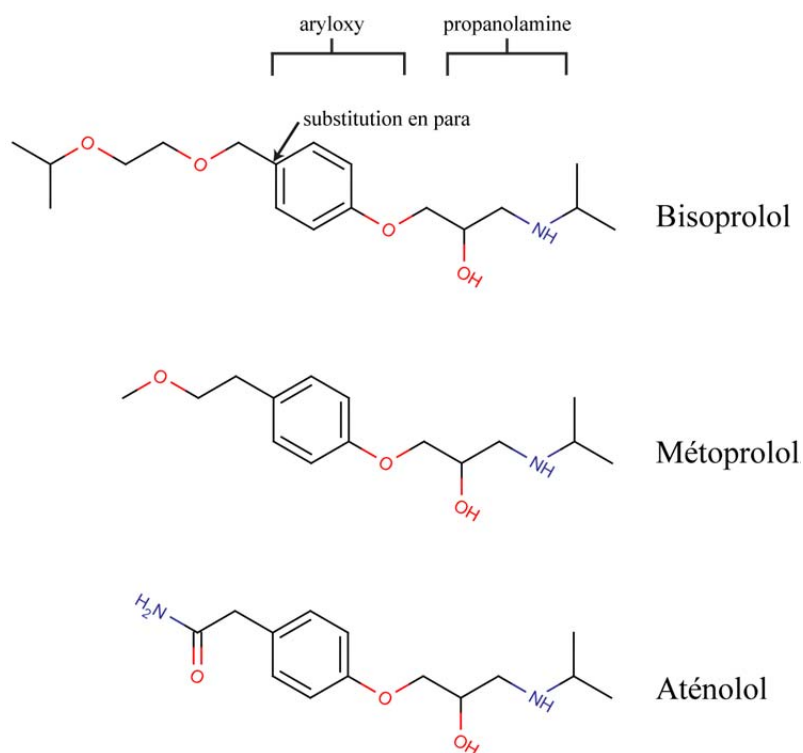


Figure 22. Structure de ligands agonistes inverses sur la voie de l'AC et des MAPK. Les groupements aryloxy et propanolamine retrouvés dans la structure de la plupart des β -bloqueurs sont indiqués. La flèche indique la substitution en para du groupement l'aryloxy des β -bloqueurs du groupe des agonistes inverses sur les voies de l'AC et des MAPK présentées dans l'article 1.

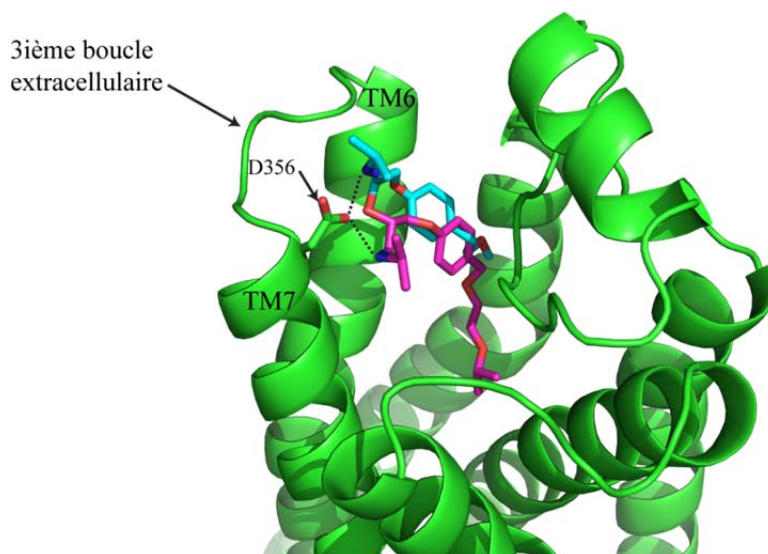


Figure 23. Arrimage moléculaire du métoprolol et du bisoprolol dans un modèle du récepteur β 1AR humain. Le métoprolol (bleu pâle) et le bisoprolol (magenta) sont représentés en bâtonnets. Les interactions électrostatiques entre la D356 et l'azote des groupements amines des ligands sont indiquées par des lignes pointillées.

Malgré l'utilité de l'approche par arrimage virtuel, son utilisation pour l'interprétation de l'efficacité des ligands possède certaines limites. D'abord, la mesure de l'efficacité d'un ligand peut être difficile à déterminer expérimentalement. En effet, alors que l'efficacité du carazolol et l'ICI-118551 est sans équivoque, l'alprénolol a été décrit à la fois comme un agoniste inverse mais aussi comme un agoniste partiel sur la voie de l'AC (Stevens and Milligan, 1998; Chidiac et al., 1994). Aussi, la classification d'un ligand sur seulement 2 voies de signalisation est très réductrice car une étude récente réalisée au laboratoire du Dr Bouvier démontre que le β 2AR peut moduler au moins une autre voie de signalisation, autrement que par les voies classiques, en induisant le calcium par le récepteur à l'IP3 (annexe 5, page vi de la section annexe). Cette étude suggère donc l'existence d'autres voies de signalisation activées par le β 2AR. Ainsi, la détermination de l'efficacité des β -bloqueurs dans ces voies sera nécessaire pour mieux regrouper les composés. Il est probable qu'avec l'augmentation du

nombre de voies considérées pour les β -bloqueurs, leur classification évoluera. De plus, le développement des technologies de type "sans marquage", où les signaux sont généralement associés à l'intégration de plusieurs voies de signalisation, influencera sans doute la façon de classer les β -bloqueurs. À ce titre, une étude récente analysant le changement d'impédance électrique de cellules HEK293 exprimant le β 2AR suite au traitement avec des ligands β -adrénergiques propose un regroupement alternatif des ligands (Stallaert et al., 2012)(annexe 5, page vi de la section annexe). De manière intéressante, dans cet article, une plus grande quantité de composé ont été analysés. Malgré cette complexité, les ligands avec une fonction branchée en para du groupement aryloxy sont restés regroupés dans la même classe, en accord avec la prédiction de leur mode similaire de liaison. Pour les autres ligands, dont les modes de liaison prédits sont similaires, comme ceux des groupes agoniste inverse AC / agoniste MAPK et antagoniste neutre AC / agoniste MAPK, la classification par impédance est largement différente, suggérant que dans ce cas le mode de liaison prédit n'est pas le seul déterminant de leur efficacité. Cependant, il est aussi possible que des variations subtiles dans le mode de liaison puissent induire des différences notables dans l'efficacité d'un ligand détectables par la mesure de l'impédance. Aussi, les expériences de simulation utilisées dans ces analyses comportent certaines limites. En effet, l'arrimage moléculaire *in silico* de ligands sur des structures rigides de récepteur ne peut tenir compte de l'impact dynamique de la liaison d'un ligand ou d'un effecteur sur la conformation du récepteur à moins que les transformations soient déjà incluses dans la structure de la cible. Dans le cas du β 2AR, même la présence d'un agoniste n'est pas suffisante pour stabiliser une fraction assez importante des récepteurs de façon à le cristalliser dans une conformation active (Audet and Bouvier, 2012)(annexe 2, page iii de la section annexe). En effet, cette dernière n'est obtenue qu'en présence de la protéine G hétérotrimérique de type G_s ou d'un anticorps émulant l'effet de l'effecteur sur le récepteur, indiquant que l'impact allostérique du couplage des effecteurs sur les récepteurs est important pour l'efficacité des ligands. Considérant qu'une partie du signal de l'activation des MAPK par les β -bloqueurs passe par l'engagement des β arres au β 2AR, l'obtention de structures cristallographiques de ce récepteur en complexe avec plusieurs autres effecteurs comme les β arres permettra de comprendre plus en profondeur la nature moléculaire de l'efficacité des β -bloqueurs. En fait, les limites d'une image de liaison statique d'un ligand sur un récepteur sont clairement démontrées par le fait que bien que l'efficacité sur la voie de l'AC de la plupart des

β -bloqueurs du groupe agoniste inverse AC / agonistes MAPK varie en intensité (Chidiac et al., 1994), leur mode de liaison est similaire sur le β 2AR. Cependant, même avec ces contraintes, des hypothèses concernant l'efficacité peuvent quand même en être déduites. Par exemple, le TM5 interagit avec le groupement catéchol des agonistes de la voie de l'AC pour servir d'intermédiaire à leur action (Liapakis et al., 2000; Strader et al., 1989; Shi and Javitch, 2002). Or, la région la plus variable des β -bloqueurs du groupe agoniste inverse AC / agonistes MAPK est la fonction aryl qui interagit aussi avec le TM5 (figure 24, page 220 de la section discussion), suggérant que ce domaine pourrait être aussi impliqué dans la transmission de l'efficacité des ligands agonistes inverses sur la voie de l'AC. En accord avec cette hypothèse, la mutation de 2 résidus du β 2AR (T118I, S203A) localisés sur le TM5 ou interagissant avec des résidus de ce domaine bloque l'effet agoniste inverse de l'ICI-118551, mais pas l'efficacité agoniste de l'isoprotérénol (figure 25, page 222 de la section discussion). De plus, au moins pour la S203A, la perte de l'effet agoniste inverse n'est probablement pas la conséquence de la perte d'affinité du ligand, car l'ICI-118551 n'a pas d'hétéroatome sur le groupement aryl requis pour interagir de manière électrostatique avec le groupement alcool de ce résidu (Liapakis et al., 2000). De plus, pour les deux mutants, l'efficacité agoniste inverse de l'ICI-118551 n'est pas retrouvée par l'augmentation de leur activité basale lorsque la quantité de récepteur transfecté est augmentée, suggérant que la perte d'efficacité agoniste inverse de l'ICI-118551 n'est pas non plus la conséquence d'une diminution de l'activité constitutive du récepteur mutant. Ensemble, ces résultats suggèrent que le TM5 joue un rôle dans la transmission de l'efficacité agoniste inverse de l'ICI-118551 sur la voie de l'AC. Toutefois, une étude plus approfondie des déterminants de l'efficacité dans cette région doit être effectuée afin d'élucider les mécanismes précis de l'implication du TM5 dans l'efficacité agoniste et agoniste inverse. Ainsi, malgré ces limites, il est clair que l'arrimage virtuel de ligands sur des structures cristallines de récepteur permet d'énoncer des hypothèses vérifiables sur les mécanismes de l'efficacité des ligands. Dans le contexte du développement récent de la cristallographie aux rayons X des RCPG, cette approche, de même que les approches d'analyses de liaison par dynamique moléculaire comme celle présentée plus haut qui incluent les conformations alternatives de récepteurs (Dror et al., 2011), constituent des outils importants pour comprendre l'efficacité d'un couple ligand/récepteur.

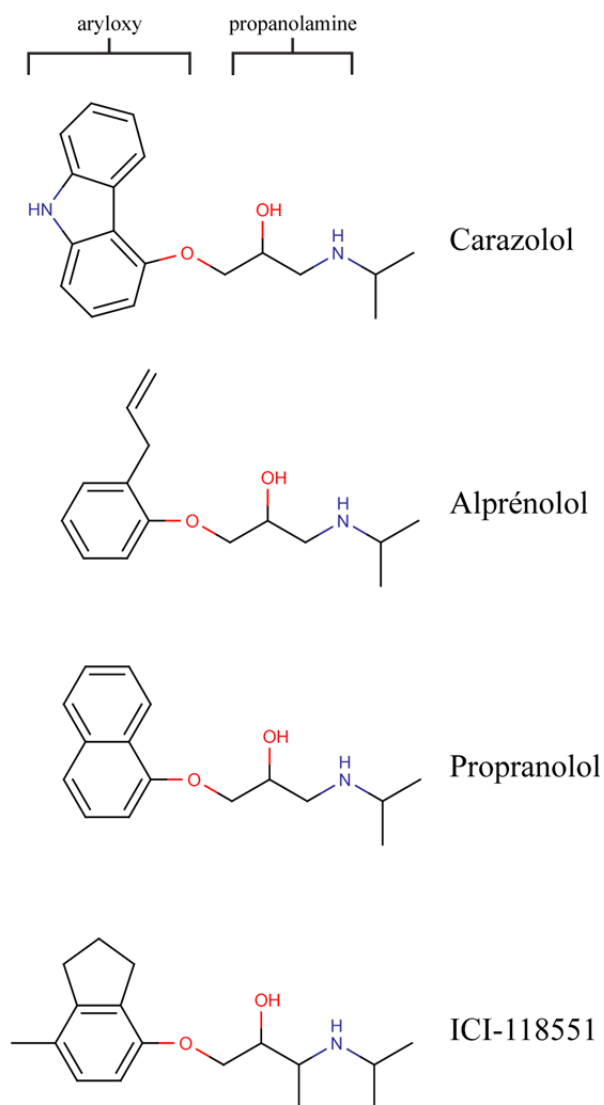


Figure 24. Structure chimique de β -bloqueurs agonistes inverse AC / agonistes MAPK.
 Les groupements aryloxy et propanolamine retrouvés dans la structure de la plupart des β -bloqueurs sont indiqués.

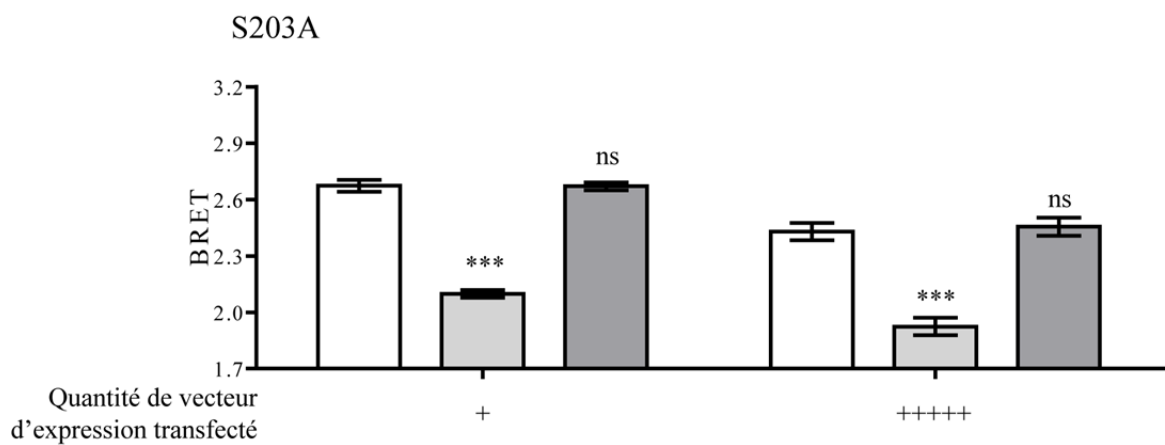
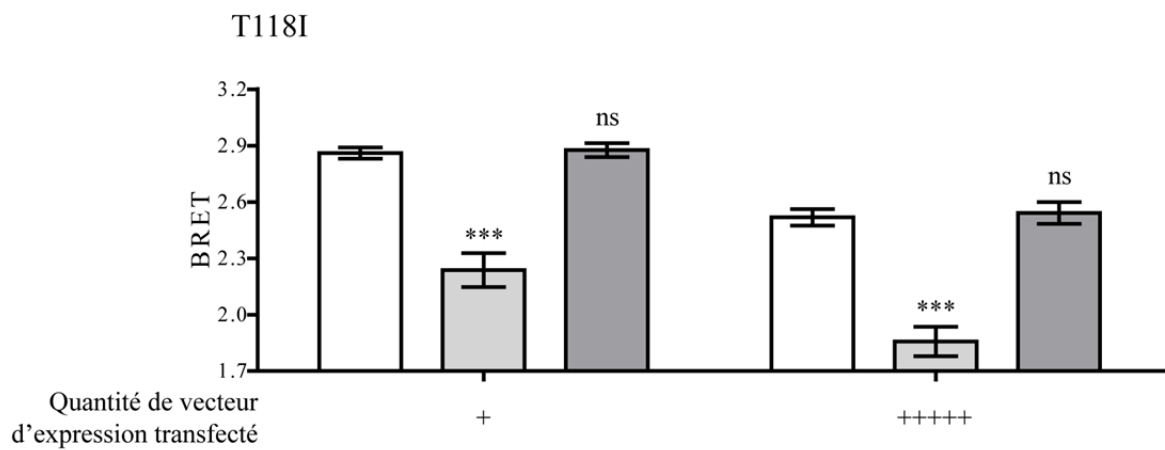
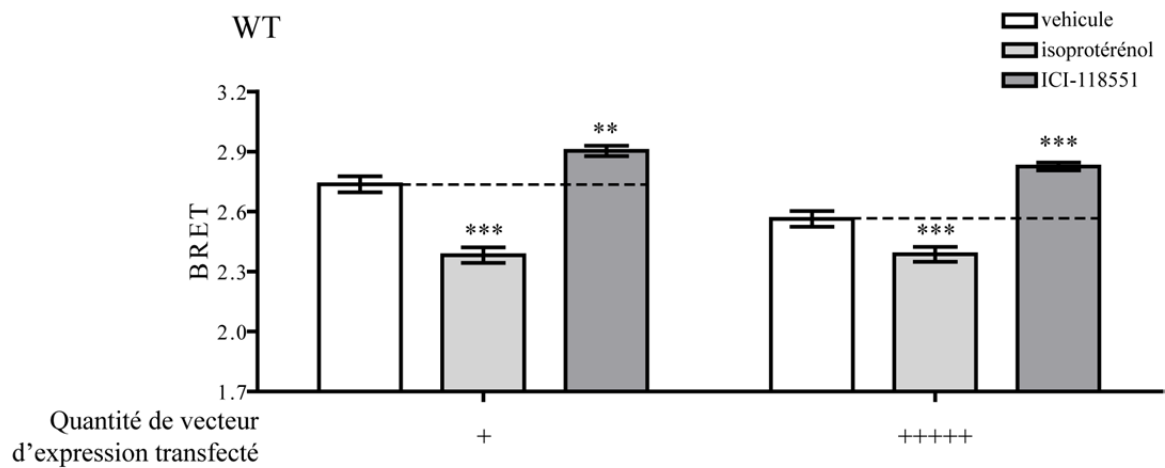


Figure 25. Efficacité de l'ICI-118551 et de l'isoprotérénol dans la voie de l'AC sur des mutants du $\beta 2AR$. Des cellules HEK293 exprimant de manière transitoire le $\beta 2AR$ ou les formes mutantes T118I et S203A, ainsi que le biosenseurs BRET-EPAC pour la détection du cAMP intracellulaire, sont traitées avec 10 μM de composés pendant 30 minutes tel qu'indiqué avant la lecture du signal BRET. La variation du signal BRET provenant du biosenseur est inversement proportionnelle à la variation de la concentration d'AMPc intracellulaire. Les lignes pointillées indiquent l'accumulation basale d'AMPc pour le $\beta 2AR$ de type sauvage. Les résultats sont la moyenne \pm la déviation standard sur la moyenne de 4 à 8 expériences indépendantes. La significativité statistique des signaux de BRET a été déterminée par un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de type Dunnett contre le signal obtenu dans les conditions de stimulation par le véhicule. (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; ns = non significatif).

Importance du développement d'outils moléculaires pour étudier les β arrs

Un couple ligand/récepteur peut activer plusieurs voies de signalisation de manière dépendante, mais aussi indépendante de l'engagement des protéines G hétérotrimériques. En plus de leur rôle de régulateurs des RCPGs, les β arrs sont les effecteurs les plus connus impliqués dans l'activation de la signalisation indépendante des protéines G hétérotrimériques. Aussi, le caractère pléiotropique des fonctions des β arrs, conféré par leurs propriétés d'échafaudage de multiples facteurs cellulaires, suggère que leur rôle est aussi important que les protéines G hétérotrimériques dans la signalisation des RCPGs. En accord avec cette hypothèse, les études sur des souris *knock-out* des β arrs démontrent leur importance dans plusieurs systèmes physiologiques. Pourtant, il y a très peu d'outils moléculaires pour étudier les β arrs et le développement de nouvelles approches est important pour disséquer leurs rôles cellulaires et physiologiques, au-delà de celui classique de la désensibilisation des récepteurs. Ainsi, la deuxième partie de ma thèse a été dédiée au développement d'outils pour l'étude des fonctions des β arrs et couvre le développement des applications du BRET en microscopie, *in vivo* et le développement de petits composés organiques pour moduler leurs activités.

Développement de nouvelles applications du BRET

BRET en microscopie

L'étude des interactions entre macromolécules et la détermination de leur localisation subcellulaire est importante pour comprendre leurs fonctions. La microscopie de fluorescence est une méthode abondamment utilisée pour déterminer la localisation cellulaire d'une protéine. Cependant, la résolution d'une image de microscopie de fluorescence ne permet pas de mesurer directement l'interaction directe entre 2 protéines, puisque le diamètre représentatif (~10 nm) d'un complexe protéique est largement inférieur à la longueur d'onde de la lumière visible. Ainsi, ces dernières années, plusieurs stratégies de mesures d'interactions protéine-protéine en microscopie ont été mises au point tel que le recouvrement de fluorescence après *photobleaching* (FRAP), qui détermine la différence des vitesses de diffusion entre une protéine dans un complexe vs la même molécule libre d'interaction, ou bien les approches de complémentation fonctionnelle de fragment de protéine (PCA) permettant la reconstitution la fluorescence d'une GFP ou du signal d'une enzyme seulement lors d'une interaction protéine-protéine (Gousseva et al., 2008; Hu et al., 2002). Le FRET est aussi une approche utilisée pour l'étude de la localisation subcellulaire des complexes protéiques en microscopie. Cependant, la nécessité d'exciter un chromophore avec une source lumineuse intense induit beaucoup d'artéfacts comme l'excitation non-spécifique de l'échantillon ou de l'accepteur énergétique ce qui augmente le bruit de détection et réduit la précision de l'essai. Ainsi, plusieurs images contrôles et un traitement mathématique intensif sont nécessaires pour déterminer la contribution du transfert énergétique dans l'image obtenue (Jares-Erijman and Jovin, 2003). Pour sa part, le BRET comporte beaucoup de similitudes avec le FRET. Un des avantages importants du BRET par rapport au FRET est que l'excitation de l'accepteur énergétique par un substrat interne lié au donneur, qui n'émet qu'une faible quantité de lumière, prévient le problème d'excitation non-spécifique de l'échantillon, le *photobleaching* et la contamination du signal par l'excitation directe de l'accepteur énergétique. Ainsi, le traitement de l'image et la détermination du transfert énergétique en BRET est théoriquement plus facile qu'en FRET. Dans l'article 2 de cette thèse (page 109 de la section résultats), nous avons tenté de valider la possibilité de détecter et de localiser une interaction protéine-protéine en temps réel grâce à la

mesure des signaux de BRET au microscope. Dans cette étude, nous avons détecté du signal BRET constitutif provenant de protéines de fusions entre des partenaires BRET, ou induit par l'association des fusions β arr2-RLuc et V2R-YFP suite à la stimulation par un agoniste du récepteur. Les images obtenues ont suffisamment de résolution pour localiser le signal dans des compartiments subcellulaires, notamment entre le noyau et le cytoplasme d'une même cellule. Cette étude constitue donc la première preuve de principe qu'il est possible de localiser le signal de BRET de manière subcellulaire.

De manière intéressante, tout comme dans une lecture en plaque, le ratio BRET provenant d'un échantillon n'exprimant que la *RLuc* est indépendant de l'intensité du signal de luminescence. Ainsi, la seule correction du ratio requise pour déterminer le signal de transfert est la soustraction directe du signal ratiométrique en absence de transfert énergétique, constituant un avantage important sur la microscopie FRET. Par contre, la faible émission de lumière par la coelenterazine constitue la principale barrière pour la détection du BRET au microscope et la première étape de cette étude a été de déterminer les conditions expérimentales de détection de la luminescence de la *RLuc* par microscopie. La résolution d'une image de faible intensité en microscopie dépend de la capacité d'un signal d'émerger du bruit de fond. Ainsi, l'optimisation des paramètres qui influencent le signal et le bruit est importante pour obtenir une image de haute résolution en BRET. Aussi, plusieurs précautions expérimentales doivent être envisagées afin d'optimiser la détection de luminescence. D'abord, il faut limiter au strict nécessaire les dispositifs optiques comme des filtres dichroïques, les miroirs ou les lentilles dans le chemin de détection de la lumière et utiliser ceux dont les caractéristiques spectrales permettant une meilleure transmission de la lumière. Ensuite, il faut prévenir la contamination lumineuse ambiante en confinant dans la noirceur totale la chambre de lecture. En effet, la quantité de lumière émise par une luciférase est nettement inférieure à celle d'une pièce sombre. Finalement, il faut utiliser des caméras avec des bruits de lecture et intrinsèque très bas et qui possèdent une sensibilité de détection élevée. Au début de cette étude, les caméras n'étaient pas assez performantes pour détecter la luminescence provenant de la *RLuc*. Cependant, rapidement nous avons pu tester plusieurs caméras incorporant de nouvelles technologies comme un détecteur CCD couplé à un amplificateur de signal ce qui nous a mené à déterminer qu'à l'époque, la cascade, la caméra utilisée dans l'article 2, semblait

avoir les meilleures capacités de détection de luminescence. Ce fut un choix judicieux qui a permis au groupe du Dre Perroy de réaliser plusieurs études en utilisant le BRET au microscope notamment pour visualiser des interactions protéines-protéines de manière subcellulaire sur des neurones (Moutin et al., 2012b; Moutin et al., 2012a). Le prochain paragraphe décrit les paramètres techniques concernant le bruit de fond qui ont été considérés pour la sélection de la caméra.

Un détecteur CCD est composé d'un regroupement de petites cellules photoélectriques (pixels) qui constituent un écran sur lequel l'image sera projetée et transmise à un ordinateur. Chaque pixel capte des photons de lumière et accumule ainsi une charge électrique. De temps en temps, la charge de chaque pixel est déterminée et réinitialisée. Le nombre de fois par seconde que cet évènement se produit est décrit par la fréquence du détecteur. L'information de la charge de chaque pixel est ainsi transmise à un ordinateur qui reconstitue l'image sur un écran. Les paramètres d'une caméra sont donc souvent décrits par la charge d'un électron e^- et chaque pixel peut accumuler une centaine de milliers de charges électroniques. Il existe plusieurs sources de bruit provenant des caméras dont 2 sont prédéterminées par les spécifications techniques de la caméra: le bruit noir (intrinsèque) provenant de l'accumulation de charges par la chaleur des pixels et de l'électronique intrinsèque de l'appareil, et le bruit de lecture, influencé en outre par la fréquence du détecteur CCD. Ainsi, le bruit noir influence l'ordonnée à l'origine du signal et augmente en fonction du temps d'intégration du signal. Par contre, le bruit de lecture est indépendant du temps de lecture et influence plutôt la déviation standard du signal détecté. La capacité d'une caméra à détecter les quelques photons d'un signal de luminescence provenant de la *RLuc* dépend de la capacité du signal de se démarquer de ces signaux de bruit. Ainsi, l'intégration trop longue d'un signal va augmenter le bruit noir, mais suffisamment de photons captés seront nécessaires pour que le bruit de lecture ne soit pas trop significatif par rapport au signal. L'utilisation de la technologie de couplage à un multiplicateur de signal permet de diminuer drastiquement le bruit de lecture sur les caméras CCD, par exemple de 45 à 1 e^- par rms pour la cascade permettant ainsi la détection du BRET au microscope. Cependant, d'autres caméras qui peuvent fonctionner à des fréquences très inférieures aux caméras conventionnelles et qui n'incorporent pas la technologie de couplage à un multiplicateur de signal ont aussi des propriétés de bruit de lecture comparable à la cascade

en mode multiplicateur de signal. Ainsi, une de ces caméras, la PIXIS, possède un bruit noir très inférieur à la cascade (0.02 e⁻ / pixel / seconde pour la PIXIS vs 1 e⁻ / pixel / seconde pour la cascade) permettant une plus longue intégration du signal. Des images de BRET analogues à celles montrées à la figure 2 de l'article 2 (page 128 de la section résultats) ont pu être générées à l'aide de cette caméra indiquant que plusieurs stratégies de contrôle du bruit sont possibles pour la détection du signal. Récemment, de nouvelles caméras comme la PROEM1024 combinant un très faible bruit noir (0.002 e⁻ / pixel / seconde) et les avantages de la technologie de couplage à un multiplicateur de signal sur le bruit de lecture (1 e⁻ rms) sont entrées sur le marché. Ces nouvelles caméras pourront assurément repousser les limites de la détection du BRET au microscope.

En plus de ces caméras, l'utilisation de nouvelles luciférases avec des propriétés d'émission de luminescence améliorées et qui sont dérivées de la séquence native de la *RLuc* comme la *RLuc8*, ou de la crevette *Oplophorus gracilirostris* comme la *nanoluc* (Loening et al., 2006; Hall et al., 2012), permettront d'améliorer la résolution de l'image BRET. À ce titre, la *RLuc8* a été utilisée récemment en microscopie BRET pour détecter l'association entre un RCPG et une protéine d'échafaudage ainsi que l'activation des MAPK directement sur des neurones (Xu et al., 2013; Moutin et al., 2012b).

Les fonctions des β arrs comme l'activation des MAPK dans les endosomes, le contrôle de la transcription dans le noyau cellulaire ou bien la désensibilisation des RCPGs à la membrane plasmique dépendent de la localisation subcellulaire de l'interaction entre les β arrs et ses effecteurs. À ce titre, il a été possible dans l'étude de l'article 2 de mesurer la cinétique et la dose réponse du recrutement de la β arr2 au V2R, un récepteur connu pour interagir fortement avec les β arrs. Les temps de demi-vie et d'EC50 donnent des résultats similaires à ce qui est retrouvé dans les lecteurs de plaques, indiquant que le BRET au microscope est un outil valable pour étudier la pharmacologie des interactions. Aussi, avec des résultats similaires, le BRET au microscope a l'avantage de pouvoir localiser les interactions de manière subcellulaire contrairement aux lecteurs de plaques. Bien qu'à l'époque, des études publiées simultanément à la notre avait montré qu'il était possible de détecter un signal BRET sur une seule cellule (Xu et al., 2007; De et al., 2007), et même de localiser une interaction protéine-protéine de manière subcellulaire (Xu et al., 2007), notre étude se distingue d'une part

par notre capacité à définir la pharmacologie de l'interaction, et d'autre part, de déterminer la localisation subcellulaire du signal BRET même en présence d'un signal négatif environnant, présent notamment à cause des β arr2-RLuc aux alentours des vésicules endocytiques qui n'interagissent pas avec le V2R-YFP. Même si l'article 2 ne montre pas de nouveaux rôles cellulaires de la β arr2, la preuve de concept de la détection localisée du recrutement de la β arr2 au V2R à l'aide de la microscopie BRET ouvre la voie à la localisation des interactions entre la β arr et ses partenaires permettant de mieux comprendre leurs impacts dans un contexte cellulaire.

BRET dans un contexte de souris transgéniques

La mesure des interactions protéine-protéine dans un environnement natif est importante pour valider les modèles moléculaires dérivés d'expériences sur des cellules immortalisées en culture. Grâce à ses partenaires bioluminescents codés génétiquement, le BRET peut être utilisé dans un contexte physiologique. À cette fin, quelques études antérieures avaient décrit la détection du BRET provenant de cellules immortalisées exprimant des biosenseurs injectés dans des souris (De and Gambhir, 2005; De et al., 2007; De et al., 2009; Dragulescu-Andrasi et al., 2011; Huang et al., 2007). Ce genre d'approche a le potentiel de détecter des phénomènes physiologiques de manière non-invasive, comme la présence d'une hormone, grâce à la détection du signal BRET directement à travers une souris. Par exemple, une de ces études a montré la détection d'un signal BRET provenant de cellules exprimant les fusions β arr2-GFP2 et V2R-RLuc, implantées dans une souris, suite à l'injection de l'hormone AVP, l'agoniste naturel du V2R (Huang et al., 2007). De manière intéressante, cette étude utilise une fibre optique implantée au-travers la peau de l'animal pour détecter les signaux de luminescence. Cependant, dans tous ces cas, le signal BRET provient des cellules immortalisées qui sont éloignées du contexte normal des cellules dans un tissu animal. Ainsi, nous avons donc décidé de développer une nouvelle approche complémentaire de mesure d'une interaction protéine-protéine à l'aide du BRET, mais qui est plus proche de l'environnement natif des phénomènes moléculaires étudiés. Pour ce faire, nous avons généré des animaux transgéniques exprimant la β arr2 et le β 2AR fusionnée à des partenaires BRET.

L'article 3 de cette thèse (page 132 de la section résultats) présente la première preuve de principe de l'utilisation du BRET pour la mesure d'une interaction protéine-protéine dans des cellules fraîchement dérivées de tissus de ces souris transgéniques. Bien que la détection du signal s'effectue sur des cellules primaires d'un tissu, il s'agit d'une première étape avant de pouvoir mesurer une interaction protéine-protéine par BRET peut-être un jour directement sur un animal transgénique vivant. Un avantage de genre d'approche serait de pouvoir étudier l'influence de modèles pathologiques sur les réponses moléculaires étudiées. De plus, la possibilité de mesurer l'engagement de la β arr2 au β 2AR sur des cellules extraites d'une souris transgénique ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude de la signalisation biaisée dans différents tissus. Par exemple, il serait possible de déterminer le biais signalétique d'un ligand β -adrénergique dans un tissu donné et de le comparer à d'autres.

Nous avons donc caractérisé le patron d'expression des transgènes β 2AR-RLuc et GFP2- β arr2 dans divers tissus et constaté qu'ils étaient principalement exprimés dans les testicules. Alors que l'expression du β 2AR-RLuc était tout de même importante dans d'autre tissu, celle de la GFP2- β arr2 n'a été détectée que dans les testicules. Ensuite, nous avons validé la fonctionnalité de la fusion β 2AR-RLuc grâce à un essai mesurant la production d'AMPc sur des membranes de testicules de souris transgéniques. Nous avons pu aussi confirmer la sélectivité de la production de l'AMPc par le β 2AR-RLuc transgénique en utilisant un inhibiteur β -adrénergique et en comparant la réponse avec celle obtenue sur un tissus de souris non transgénique. Ensuite, nous avons détecté le recrutement induit par une agoniste de la β arr2 au β 2AR en BRET et obtenu un EC50 similaire à celui obtenu dans l'essai de production d'AMPc, en accord avec le fait que l'engagement de la β arr2 est la conséquence de l'activité du récepteur. Nous avons ainsi démontré la preuve de principe que l'association entre 2 protéines peut être détectée à l'aide du BRET dans des cellules extraites d'un tissu de souris. De plus, les résultats de BRET étaient similaires à ceux obtenus dans des lignées cellulaires transformées, supportant la validité de notre approche.

L'avantage de l'utilisation de souris transgénique est que la mesure de l'interaction protéine-protéine se fait dans un contexte d'environnement normal. Dans notre étude, les deux protéines sont exprimées à des niveaux physiologiques ou très proches. En effet, l'expression du transgène β 2AR-RLuc est similaire à celle retrouvée de manière endogène dans différents

tissus des mammifères alors que la GFP2- β arr2 est légèrement surexprimée, probablement à cause de la sélection des lignées par fluorescence. Dans le cas du GFP2- β arr2, l'expression restreinte dans les testicules empêche la détermination du BRET dans d'autres tissus. Toutefois, les deux transgènes ont chacun un rôle connu dans les testicules. En effet, le β 2AR médie en partie l'effet positif des catécholamines sur la production de testostérone (Breuiller et al., 1988) alors que la β arr2 régule négativement la signalisation de quelques RCPGs comme le récepteur de l'hormone de stimulation folliculaire (FSHR) (Marion et al., 2006), en accord avec la validité physiologique de leur étude dans ce tissu. Toutefois, dans notre étude, nous n'avons pas étudié les aspects fonctionnels de ce tissu. Il n'est pas clair pourquoi les transgènes sont plus exprimés dans les testicules que dans les autres tissus. En effet le promoteur utilisé, ROSA26, était proposé comme induisant une expression ubiquitaire d'un transgène (Kisseberth et al., 1999) ce qui explique pourquoi nous l'avons choisi. Cependant, dans cette étude, l'expression de ce fragment de promoteur dans les testicules est favorisée dans certaines lignées, suggérant que ça pourrait être une propriété intrinsèque du promoteur (Kisseberth et al., 1999). Cependant, dans cette même étude, d'autres lignées de souris expriment le transgène majoritairement dans d'autres tissus indiquant que le site d'insertion du transgène dans le génome pourrait contribuer à la distribution de l'expression dans les tissus.

Ainsi, au cours de cette étude, nous avons appris un certain nombre de leçons qui seront utiles pour la conception de la prochaine génération de souris BRET. Premièrement, des promoteurs spécifiques pour les tissus ou des promoteurs vraiment ubiquitaires devraient être utilisés à l'avenir afin de pouvoir mesurer le BRET dans d'autres tissus que les testicules. Ensuite, plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin d'augmenter la sensibilité de la détection du BRET *in vivo*. Par exemple, les variantes du BRET utilisant un accepteur d'énergie dont l'émission est décalée vers les longueurs d'ondes rouges améliorent le seuil de détection du signal au travers des tissus de souris puisque la lumière rouge est moins absorbée dans les tissus de mammifères (De et al., 2009). De plus, le développement récent de variantes de la *RLuc* avec une meilleure intensité d'émission de bioluminescence devrait aider à diminuer l'expression nécessaire pour la détection de luminescence provenant d'un transgène (Loening et al., 2006). Aussi, l'utilisation de fibre optique pour la détection du BRET sur des cellules exprimant des protéines marquées et implantées dans une souris a déjà été décrite

(Huang et al., 2007) et constitue une avenue intéressante afin de lire les signaux de luminescence directement sur un animal. Il serait intéressant de déterminer si cette technologie peut être utilisée dans le cadre d'un animal transgénique. De plus, l'élaboration d'une autre souris double transgénique devrait tenir en compte de la possibilité de la détection en fluorescence d'un transgène à des niveaux endogènes. À cette fin, plusieurs études montrent que l'expression endogène de protéines fusionnées à des GFP dans des souris *knock-in* peut être détectée dans certains tissus (Schnorbusch et al., 2013; Scherrer et al., 2006). L'avantage de l'utilisation de l'approche de type *knock-in* est d'éviter la compétition du signal BRET par la protéine endogène non-marquée. Il est probable que dans bien des tissus, la validation de l'expression de l'accepteur devra se faire par une méthode plus sensible que la fluorescence, comme l'immunodétection. Toutefois, il est à noter que même si un signal de fluorescence ne peut être établi, le BRET peut être détecté puisque la détection de l'émission de la réaction de bioluminescence est plus sensible que la détection de fluorescence. En effet, contrairement à son excitation par le BRET, l'irradiation des GFPs par une source lumineuse intense comme dans le cas de la lecture de fluorescence provoque un bruit de fond important dû à l'excitation non-spécifique des tissus ce qui diminue la sensibilité de détection du signal.

Le FRET peut être utilisé pour détecter des interactions protéine-protéine *in vivo* et avant notre étude, il avait déjà été utilisé pour détecter des activités kinases ou des seconds messagers sur des tissus dérivés de différents organismes multicellulaires exprimant de manière transgénique des biosenseurs unimoléculaires. Cependant, la détection par FRET d'une interaction entre 2 protéines requiert une grande expression des partenaires afin de s'affranchir du signal d'auto fluorescence du tissu qui est la conséquence de l'excitation directe de l'échantillon avec une source lumineuse intense, un inconvénient important pour déterminer la validité physiologique de l'essai. Ainsi, l'avantage principal de l'utilisation du BRET dans ce contexte est l'absence de bruit de fond. De plus, le substrat utilisé en BRET est biocompatible et ne représente pas de problème pour la détection de la RLuc dans les tissus animal (Bhaumik et al., 2004).

Même si la détection du BRET sur des tissus fraîchement dispersés ne confère pas les mêmes avantages que la lecture d'un signal directement chez l'animal vivant, ils sont tout de même importants par rapport à des cellules immortalisées en culture ou bien des cultures

primaires, des modèles qui sont sujet à des changements phénotypiques rapides. Notre étude est donc la première étape afin de détecter une interaction protéine-protéine *in situ* à l'aide du BRET. À ce titre, des expériences préliminaires montrent qu'il est possible de détecter un signal de BRET provenant de tranches de cerveaux extraites de souris transgéniques exprimant une protéine de fusion RLuc-eYFP sous le contrôle du même promoteur que les souris publiées dans l'article 3 (figure 26, page 232 de la section discussion). Ainsi, le BRET détecté dans le contexte de souris transgénique permettra d'élaborer plusieurs nouvelles approches expérimentales comme la détermination de l'influence d'une manipulation de l'animal à court ou long terme sur l'interaction entre deux protéines, ou bien la dynamique d'une interaction pendant le développement d'un animal. L'utilisation du BRET dans un contexte transgénique est une approche d'avenir pour développer une meilleure connaissance moléculaire de la physiologie.

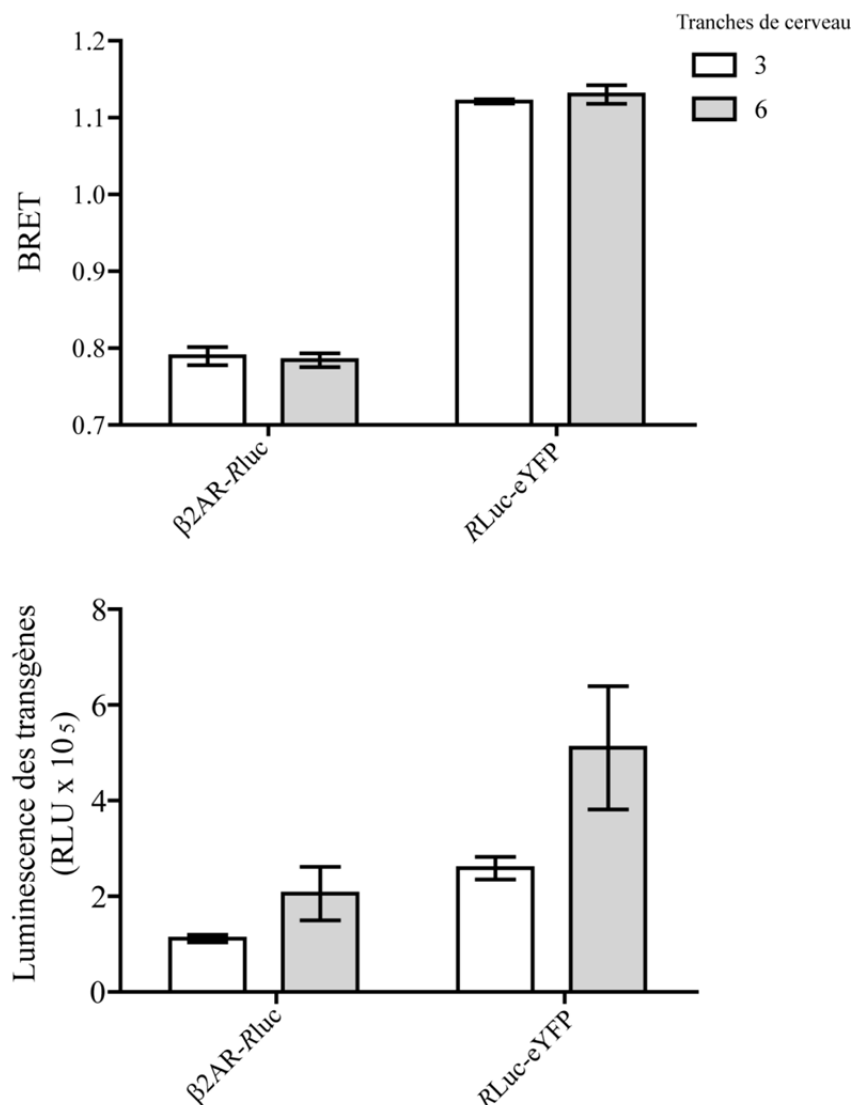


Figure 26. Détection d'un signal BRET provenant de tranches de cerveaux de souris. Signaux de BRET (panneau du haut) et de luminescence (panneau du bas) détectés sur des tranches fraîches de 300 μm d'épaisseur de cerveau de souris exprimant les protéines de fusions $\beta 2AR-RLuc$ (article 3, page 132 de la section résultats) ou $RLuc-eYFP$ (la fusion est décrite dans cet article (Angers et al., 2000)). Une quantité déterminée de tranches de cerveaux (tel qu'indiqué) est distribuée avec 100 μl de liquide cébrospinal artificiel (ACSF) par puits d'une plaques 96 puits. La détection de la luminescence est effectuée environ 45 minutes après la coupe au vibratome par un lecteur de plaque 96 puits de type mithras tel que décrit précédemment (articles 2 et 4, pages 107 et 163 de la section résultats). Les résultats sont la

moyenne \pm la déviation standard sur la moyenne de triplicata provenant d'une expérience indépendante.

Identification d'un inhibiteur pharmacologique des β arrs

Les β arrs sont des effecteurs très importants pour la régulation et la signalisation des RCPGs. Cependant, les outils disponibles pour les étudier reposent sur des approches génétiques comme les dominants négatifs, des antisenses, des ARN interférents, des cellules dérivés de souris *knock-out* et plus récemment, un activateur pharmacologique (colorants de tryphenylmethane) (Barak et al., 2013). Aucun outil pharmacologique ciblant les β arr n'existe pour inhiber leurs fonctions, ce qui limite l'étude de leur rôle dans plusieurs systèmes biologiques et de leur contribution dans plusieurs fonctions cellulaires. D'ailleurs, la surface de la β arrs contient plusieurs zones d'interactions avec des effecteurs (figures 13, 14, 15 et 17, pages 50, 52, 57 et 71, respectivement, de la section introduction). La possibilité d'inhiber sélectivement ces diverses plateformes serait un avantage considérable pour l'étude des fonctions des β arrs. Nous avons donc tenté de développer un petit composé organique modulant les fonctions des β arrs en utilisant une approche de criblage virtuel à l'aide des informations structurales disponibles sur les β arrs. L'intégrité des interactions constituant le coeur polaire des β arrs est importante pour la stabilisation de leur conformation inactive. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la liaison d'un composé à cette région pourrait la stabiliser et inhiber l'activité des β arrs. Toutefois, les seules structures cristallines des β arrs disponibles au début de cette étude étaient pour un état inactif dans laquelle la boucle *finger* est repliée et obstrue partiellement l'accès au coeur polaire, empêchant ainsi leur utilisation directe pour cribler virtuellement de petits composés organiques. Certaines études biophysiques (Hanson et al., 2006b) et quelques images de l'arrestine visuelle dans des structures cristallines (pdbid: 1ayr, chaînes B et D) suggéraient l'existence d'une conformation ouverte et étendue de la boucle *finger*. Bien qu'il fût suggéré que l'accessibilité des phosphates de la queue C-terminale des récepteurs au coeur polaire soit importante pour l'activation des β arrs, le rôle de ce changement conformationnel dans la forme active des β arrs n'était cependant pas démontré. C'est dans ce contexte que nous avons créé un modèle de la β arr où l'accès au coeur polaire

n'était pas obstrué, en dépliant la boucle *finger* pour qu'elle soit étendue, permettant ainsi de cribler virtuellement la surface de la β arr proche du coeur polaire avec des petits composés organiques. En plus par les résultats positifs que nous avons obtenus, cet artifice a récemment été validé par la structure d'une forme active de la β arr1 lié au peptide phosphorylé de la queue C-terminale du V2R (Shukla et al., 2013), confirmant que le libre accès à la région du coeur polaire est important pour l'activation des β arrs. À l'aide de différents essais cellulaires, nous avons testé et validé plusieurs des composés dont le criblage virtuel avait prédit la liaison avec la β arr. Le composé le plus actif, UM0012685, en plus de confirmer l'implication des β arrs dans l'endocytose des RCPG et dans l'activation des MAPK, nous a permis d'étudier la dynamique de l'interaction entre les β arr et les récepteurs dans les endosomes et leur rôle dans le recyclage des récepteurs. Ce composé constitue donc le premier inhibiteur permettant l'étude des fonctions des β arrs. Notre étude de l'article 4 (page 166 de la section résultats) valide donc l'utilisation combinée du criblage virtuel et des essais cellulaires pour identifier des petites molécules organiques interférant avec l'engagement par les récepteurs du coeur polaire des β arrs et nous a permis de mettre en lumière le rôle des β arrs dans le recyclage des récepteurs, une fonction qui avait été sous estimé jusqu'à maintenant.

Le mode de liaison du composé a pu être prédit grâce au résultat d'arrimage virtuel. Dans ce modèle, UM0012685 s'associe avec des résidus qui interagissent directement avec le domaine C-terminal du récepteur, ou qui se retrouvent dans la boucle lariat et dans la queue C-terminale de la β arr; des domaines qui se déplacent fortement suite à la liaison de la queue C-terminale des récepteurs (Shukla et al., 2013). Ainsi, nos résultats suggère que la liaison du composé à ces domaines stabilise l'état inactif de la β arr en compétitionnant avec la liaison de la queue C-terminale du récepteur et en maintenant la queue C-terminale de la β arr enfouie dans le N-domaine, ce qui crée un encombrement stérique pour la liaison de la queue C-terminale du récepteur. Selon ce modèle, la stabilisation de la boucle lariat en conformation inactive empêche cette dernière de coordonner la liaison des phosphates de la queue C-terminale du récepteur ce qui diminue encore plus sa liaison avec les β arrs (figure supplémentaire 5 de l'article 4, page 205 de la section résultats).

Plusieurs des résultats obtenus valident le modèle du mode d'action du ligand. D'abord, l'efficacité antagoniste de UM0012685 sur le recrutement de la β arr2 au V2R est réduite

lorsque les résidus F391 ou R393, prédits pour interagir avec le composé, sont mutés en alanine. Aussi, une variante du composé ne possédant pas la fonction bromure prédite pour interagir avec le résidu R62 de la β arr n'a aucune activité contre l'engagement de la β arr au V2R. Au contraire, l'efficacité antagoniste est préservée dans cet essai en utilisant une variante du composé dont la fonction bromure est substituée par une fonction ester de méthyl prédit, tout comme le bromure, pour interagir avec le résidu R62. Ensemble, ces résultats sont en accord avec le modèle de la liaison du composé UM0012685 sur la β arr. Aussi, l'absence d'efficacité du composé sur l'engagement de la β arr2 au récepteur de la bradykinine de type 2 (B2R) n'est pas surprenant puisque ce récepteur recrute la β arr2 de manière indépendante à la phosphorylation de sa queue C-terminale (Feierler et al., 2011). Ainsi, en accord avec la spécificité d'action du composé sur la β arr, l'utilisation d'un mutant pré-activé de la β arr2 (R170E) permet de récupérer partiellement l'efficacité antagoniste de UM0012685 sur l'engagement de la β arr2 au B2R. Ce résultat suggère aussi que le composé préfère agir sur la forme active de la β arr, probablement induite par la rencontre de la queue c-terminale phosphorylée d'un récepteur. En accord avec ce mécanisme d'action, le composé affecte la dynamique d'association de la β arr2 avec le B2R que dans le cas où la queue C-terminale du récepteur est remplacée par celle du V2R, un domaine du V2R connu pour activer les β arrs (Xiao et al., 2004; Nobles et al., 2007). Ainsi, le composé agirait sur la forme active de la β arr2 suite à l'ouverture de la boucle *finger* induite par la liaison du domaine C-terminal du récepteur ou par l'activation constitutive de la β arr. Le fait d'identifier un composé possédant ce mécanisme d'action pourrait être le résultat d'un biais induit par le modèle utilisé lors du criblage virtuel. En effet, dans ce dernier la conformation de la boucle *finger* est étrangement similaire à celle retrouvée dans les structures cristallines des formes actives de β arr1 et p44 (Shukla et al., 2013; Kim et al., 2013). Ainsi, les efficacités variables du composé sur le recrutement de la β arr à différents récepteurs reflètent fort probablement la capacité de ces derniers d'induire une conformation active sur la β arr qui est compatible avec l'action du ligand. Ensemble, ces données supportent la sélectivité d'action du composé UM0012685 sur le cœur polaire de la β arr. Cependant, bien que convainquante, la validation du mode d'action du composé demeure partielle notamment en l'absence d'une preuve expérimentale de la liaison directe du composé sur les β arrs. À cette fin, plusieurs approches biophysiques de mesure d'interaction entre un ligand et une protéine, comme la titration calorimétrique

isothermique, la cristallographie aux rayons-X ou des expériences utilisant des colonnes d'exclusions, ont été tentées avec des résultats mitigés. En effet, la solubilisation partielle du composé aux concentrations requises dans ces essais empêchait l'obtention de résultats convaincants. En remplacement, il serait possible de démontrer la spécificité d'action du composé *in vivo* en utilisant des cellules n'exprimant pas les β arrs. En effet, le composé ne devrait inhiber que la partie dépendante des β arrs de la signalisation induite par un ligand. En l'absence de β arrs, le composé ne devrait pas avoir d'effet. Toutefois, puisque les β arrs peuvent adopter plusieurs conformations, il n'est pas clair si l'ensemble des événements signalétiques décrit comme dépendants des β arrs par des essais d'inactivation génétiques peuvent être inhibés par le composé. Par exemple, bien que le B2R active les MAPK de manière dépendante des β arrs, la conformation induite par ce récepteur sur la β arr2 ne permet pas au composé de bloquer son interaction avec le B2R. Par contre, dans ce cas, le composé ne devrait pas inhiber les MAPK induites par l'activation du B2R (Zimmerman et al., 2011). Aussi, tout comme dans l'expérience de FRAP décrite dans l'article 4 (page 166 de la section résultats), l'efficacité du composé contre l'activation de la MAPK par la bradykinine devrait être retrouvée par l'utilisation d'une fusion entre le B2R et la queue C-terminale du V2R. Il est possible aussi que le composé agisse sur la β arr mais sans affecter son engagement par le B2R. Dans ce cas l'effet de liaison du composé sur les β arrs devient nécessaire pour valider son mécanisme d'action. Aussi, il n'est pas exclu que le composé UM0012685 affecte de manière non-spécifique des phénomènes cellulaires qui ne sont pas mesurés directement et la spécificité absolue de n'importe quel outil pharmacologique est difficile à déterminer à moins que le composé ait une affinité très grande pour sa cible. Ainsi, l'amélioration de la puissance du composé par chimie médicinale devrait aussi être envisagée.

La puissance similaire de UM0012685 pour l'inhibition de l'endocytose du V2R et de l'engagement de la β arr2 avec ce récepteur confirme son utilité dans l'étude du rôle de la β arr dans l'endocytose des récepteurs. De plus, le composé bloque aussi l'activation de ERK1/2 par V2R, en accord avec l'inhibition de la signalisation en aval de la β arr. Aussi, bien que le composé n'inhibe pas le recrutement de la β arr au récepteur à la bradykinine de type 2 (B2R), il inhibe son engagement à plusieurs autres récepteurs, ce qui fait de ce composé un outil intéressant pour l'étude de l'activation de la β arr par les RCPGs.

La stabilité de l'interaction entre les β arrs et les récepteurs a été suggérée comme importante pour la régulation du recyclage des récepteurs à la membrane plasmique. Une forte interaction entre un récepteur et les β arrs corrèle avec la rétention du complexe dans les endosomes, alors que les récepteurs qui n'interagissent que faiblement avec les β arrs sont généralement recyclés à la surface cellulaire. De manière intéressante, le composé inhibe l'interaction entre la β arr2 et le β 2AR mais aussi le recyclage du récepteur, suggérant que leur interaction avec les β arrs n'est pas le seul déterminant dans ce phénomène. En fait, le rôle positif de la β arr dans le recyclage a déjà été décrit pour quelques récepteurs. La compréhension limitée de l'implication des β arrs dans le recyclage n'est pas surprenant. En effet, pour la majorité des récepteurs dont l'endocytose est dépendante des β arrs, l'étude du rôle des β arrs dans le recyclage est difficile par des moyens génétiques puisque l'endocytose est requise pour le recyclage. Les mécanismes par lesquels les β arrs pourraient favoriser ce phénomène sont inconnus. Cependant, les β arrs interagissent avec la ArfGAP, AGAP2, une protéine favorisant le recyclage du β 2AR (Wu et al., 2013). Il est donc possible que le composé inhibe le recyclage du récepteur en bloquant l'interaction avec cet effecteur. Il est probable que le composé révélera l'implication positive des β arrs dans le recyclage d'autres récepteurs. Ainsi, il est intéressant de constater que l'inhibition de l'association de la β arr2 avec le V2R dans les endosomes n'induit pas le recyclage de ce récepteur, en accord avec les résultats obtenus pour le β 2AR.

Nos travaux ont permis de démontrer qu'une approche de criblage virtuel présentait des avantages puisqu'elle permet de classer les composés selon leur propension à être des candidats actifs. Il permet de définir une liste de composés les plus susceptibles d'être positif. Le taux de succès de notre criblage virtuel (4 composés sur 66 testés, 6%) est nettement au-dessus des taux de succès normaux d'une campagne de criblage à haut débit qui est classiquement de 0.1 %, validant ainsi notre approche et le modèle utilisé. Aussi, l'avantage du criblage virtuel par rapport au criblage à haute densité est que l'on peut cibler une région sur une structure afin de biaiser un mécanisme d'action des composés. C'est un atout important dans le contexte où des multiples fonctions cellulaires des β arrs conférées par leur rôle de facteur d'échafaudage complique la mise au point d'une approche de criblage de haut débit ciblant spécifiquement les β arrs. En effet, bien que dans tout criblage, la modulation de

chacune des fonctions étudiées peut être la conséquence d'une action non-spécifique d'un composé, l'absence de traceur pré-existant liant les β arrs permettant des expériences de détection de la liaison par compétition ou bien l'absence d'activité enzymatique directe complique la validation des candidats. Le ciblage d'une région par arrimage virtuel permet de mieux identifier les essais nécessaires pour la validation. Dans l'étude de l'article 4, nous avons employé un essai d'internalisation du V2R en FACS comme essai primaire, en accord avec le rôle du coeur polaire dans la relâche de la queue C-terminale des β arrs et conséquemment, dans l'initiation du recrutement de la machinerie d'endocytose. D'autres régions sur les β arrs auraient pu être ciblées par le criblage virtuel comme celle qui supporte la liaison de c-Src, certains sites de liaison des MAPK ou la cavité concave du c-domaine des β arrs. Cette région est le site de liaison de haute affinité de l'inositol-6-phosphate (IP6) cellulaire, un déterminant de la dimérisation des β arrs (Milano et al., 2006). Un composé liant cette région pourrait être utile pour étudier le rôle cellulaire de la dimérisation des β arrs. De plus, les β arrs peuvent adopter plusieurs conformations selon leur association avec des effecteurs et beaucoup d'efforts sont déployés dans la résolution des structures cristallines de ces complexes. Ainsi, des sites supplémentaires pourront vraisemblablement être identifiés de ces nouvelles structures afin de développer par arrimage virtuel d'autres types de composés ciblant les β arrs. De plus, des composés pourront être aussi développés pour les effecteurs partenaires des β arrs, afin de moduler indirectement les fonctions des β arrs. À ce titre, grâce à une approche de criblage virtuel sur le co-cristal entre AP2 et la queue C-terminale de β arr1, le laboratoire du Dr Bouvier a récemment identifié un inhibiteur de l'interaction entre AP2 et la queue C-terminale des β arrs. Ainsi, tout en liant AP2 et non les β arrs, ce composé bloque quand même l'endocytose dépendante des β arrs.

Finalement, le composé UM0012685 identifié dans l'étude présenté dans l'article 4 de cette thèse (page 166 de la section résultats) sera un outil important pour découvrir les rôles cellulaires et physiologiques des β arrs dans le contexte de la régulation de l'adressage des RCPG, mais aussi l'activation biaisé des voies de signalisation.

Conclusion

Ces dernières années, un nouveau paradigme a émergé pour décrire la transduction du signal provenant des RCPGs. Le modèle a évolué de l'activation de la signalisation par l'engagement d'un seul effecteur, décrit par des pionniers comme sensible aux nucléotides de type guanosine et appelées protéines G hétérotrimériques, à une signalisation complexe induite par plusieurs effecteurs engagés par des conformations spécifiques de récepteurs. En pleine effervescence de la publication d'études sur le sujet, il se dégage deux aspects importants. Premièrement, l'apparition de la première structure des RCPGs liant des ligands diffusibles, suivie de plusieurs autres structures de RCPGs, offre une première vraie carte de navigation pour étudier les déterminants moléculaires de la signalisation des récepteurs. Ensuite, les β arrs découverts *a priori* pour leur rôle dans la désensibilisation du signal des protéines G hétérotrimériques, constituent un effecteur important de la signalisation indépendante des protéines G hétérotrimériques, et par le fait même représentent un élément de diversification de la signalisation par son rôle d'échafaudage de dizaines d'effecteurs. Cette thèse s'inscrit dans cette période de changement de paradigme et tente d'explorer les déterminants moléculaires de la signalisation à l'aide de la structure cristalline du β 2AR et de simulation de liaison de ligand sur le récepteur. La contribution importante du TM5 sur l'efficacité des agonistes inverses du β 2AR a pu être démontrée et des prédictions sur le rôle d'éléments de structures des β -bloqueur sur l'efficacité du récepteur ont été suggérées. De plus, des outils importants pour l'étude du rôle des β arrs dans différents contextes ont été développés. Les preuves de principes que le BRET peut être utilisé pour détecter une interaction protéine-protéine au microscope et dans un contexte de souris transgéniques offrent des approches supplémentaires notamment pour l'étude des rôles des effecteurs des β arrs lorsque la connaissance de la localisation de l'interaction est importante pour valider une hypothèse ou bien pour l'étude d'une interaction dans un contexte natif, plus proche de la réalité physiologique que les cultures cellulaires immortalisées. L'utilité de ces outils dépasse l'étude des β arrs car l'utilisation du BRET au microscope ou dans un contexte de souris transgéniques a depuis été appliquée à d'autres systèmes moléculaires. Enfin, le composé inhibant les fonctions des β arrs constitue le premier inhibiteur pharmacologique de cette famille de

protéine et sera un outil important pour disséquer la contribution des β arrs dans différents phénomènes cellulaires et physiologiques. Ensemble, les résultats de cette thèse ouvriront la voie à une meilleure compréhension des déterminants de la signalisation des RCPGs.

Bibliographie

Ablad,B., Carlsson,E., and Ek,L. (1973). Pharmacological studies of two new cardioselective adrenergic beta-receptor antagonists. *Life Sci. I. 12*, 107-119.

Adam,L., Bouvier,M., and Jones,T.L. (1999). Nitric oxide modulates beta(2)-adrenergic receptor palmitoylation and signaling. *J. Biol. Chem. 274*, 26337-26343.

AHLQUIST,R.P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol 153*, 586-600.

Ahn,S., Kim,J., Hara,M.R., Ren,X.R., and Lefkowitz,R.J. (2009). {beta}-Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. *J. Biol. Chem. 284*, 8855-8865.

Ahn,S., Shenoy,S.K., Wei,H., and Lefkowitz,R.J. (2004). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J. Biol. Chem. 279*, 35518-35525.

Alves,I.D., Salamon,Z., Varga,E., Yamamura,H.I., Tollin,G., and Hruby,V.J. (2003). Direct observation of G-protein binding to the human delta-opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem. 278*, 48890-48897.

Angers,S., Salahpour,A., Joly,E., Hilaiet,S., Chelsky,D., Dennis,M., and Bouvier,M. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97*, 3684-3689.

Aris,L., Gilchrist,A., Rens-Domiano,S., Meyer,C., Schatz,P.J., Dratz,E.A., and Hamm,H.E. (2001). Structural requirements for the stabilization of metarhodopsin II by the C terminus of the alpha subunit of transducin. *J. Biol. Chem. 276*, 2333-2339.

Audet,M. and Bouvier,M. (2012). Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell 151*, 14-23.

Azzi,M., Charest,P.G., Angers,S., Rousseau,G., Kohout,T., Bouvier,M., and Pineyro,G. (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 100*, 11406-11411.

Bae,H., Cabrera-Vera,T.M., Depree,K.M., Graber,S.G., and Hamm,H.E. (1999). Two amino acids within the alpha4 helix of Galphai1 mediate coupling with 5-hydroxytryptamine1B receptors. *J. Biol. Chem. 274*, 14963-14971.

Baker,J.G. (2005). The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol. 144*, 317-322.

- Barak, L.S., Bai, Y., Snyder, J.C., Wang, J., Chen, W., and Caron, M.G. (2013). Triphenylmethane dye activation of Beta-arrestin. *Biochemistry* 52, 5403-5414.
- Barlic, J., Andrews, J.D., Kelvin, A.A., Bosinger, S.E., DeVries, M.E., Xu, L., Dobransky, T., Feldman, R.D., Ferguson, S.S., and Kelvin, D.J. (2000). Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1. *Nat. Immunol.* 1, 227-233.
- Barrett, A.M., Carter, J., Fitzgerald, J.D., Hull, R., and Le, C.D. (1973). A new type of cardioselective adrenoceptive blocking drug. *Br. J. Pharmacol.* 48, 340P.
- Barroso, S., Richard, F., Nicolas-Etheve, D., Kitabgi, P., and Labbe-Jullie, C. (2002). Constitutive activation of the neurotensin receptor 1 by mutation of Phe(358) in Helix seven. *Br. J. Pharmacol.* 135, 997-1002.
- Barthet, G., Carrat, G., Cassier, E., Barker, B., Gaven, F., Pillot, M., Framery, B., Pellissier, L.P., Augier, J., Kang, D.S., Claeysen, S., Reiter, E., Baneres, J.L., Benovic, J.L., Marin, P., Bockaert, J., and Dumuis, A. (2009). Beta-arrestin1 phosphorylation by GRK5 regulates G protein-independent 5-HT₄ receptor signalling. *EMBO J.* 28, 2706-2718.
- Bartlett, S.E., Enquist, J., Hopf, F.W., Lee, J.H., Gladher, F., Kharazia, V., Waldhoer, M., Mailliard, W.S., Armstrong, R., Bonci, A., and Whistler, J.L. (2005). Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 11521-11526.
- Basil, B., Clark, J.R., Coffee, E.C., Jordon, R., Loveless, A.H., Pain, D.L., and Wooldridge, K.R. (1976). A new series of cardioselective adrenergic beta-receptor blocking compounds. 1-(2-Acyl-4-acylaminophenoxy)-3-isopropylaminopropan-2-ols. *J. Med. Chem.* 19, 399-402.
- Beaulieu, J.M., Marion, S., Rodriguiz, R.M., Medvedev, I.O., Sotnikova, T.D., Ghisi, V., Wetsel, W.C., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2008). A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* 132, 125-136.
- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2005). An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122, 261-273.
- Benovic, J.L., Regan, J.W., Matsui, H., Mayor, F., Jr., Cotecchia, S., Leeb-Lundberg, L.M., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1987). Agonist-dependent phosphorylation of the alpha 2-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 262, 17251-17253.
- Bernstein, L.S., Ramineni, S., Hague, C., Cladman, W., Chidiac, P., Levey, A.I., and Hepler, J.R. (2004). RGS2 binds directly and selectively to the M1 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop to modulate Gq/11alpha signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 21248-21256.
- Berthouze, M., Venkataramanan, V., Li, Y., and Shenoy, S.K. (2009). The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J.* 28, 1684-1696.

Bhatnagar,A., Willins,D.L., Gray,J.A., Woods,J., Benovic,J.L., and Roth,B.L. (2001). The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT_{2A} receptors during endocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 8269-8277.

Bhaumik,S., Lewis,X.Z., and Gambhir,S.S. (2004). Optical imaging of Renilla luciferase, synthetic Renilla luciferase, and firefly luciferase reporter gene expression in living mice. *J. Biomed. Opt.* 9, 578-586.

Black,J.W. and Leff,P. (1983). Operational models of pharmacological agonism. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 220, 141-162.

Blahos,J., Fischer,T., Brabet,I., Stauffer,D., Rovelli,G., Bockaert,J., and Pin,J.P. (2001). A novel site on the Galpha -protein that recognizes heptahelical receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 3262-3269.

Blahos,J., Mary,S., Perroy,J., de,C.C., Brabet,I., Bockaert,J., and Pin,J.P. (1998). Extreme C terminus of G protein alpha-subunits contains a site that discriminates between Gi-coupled metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 25765-25769.

Bos,J.L., Rehmann,H., and Wittinghofer,A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.

Bouvier,M., Collins,S., O'Dowd,B.F., Campbell,P.T., De,B.A., Kobilka,B.K., MacGregor,C., Irons,G.P., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1989). Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J. Biol. Chem.* 264, 16786-16792.

Brasselet,S., Guillen,S., Vincent,J.P., and Mazella,J. (2002). Beta-arrestin is involved in the desensitization but not in the internalization of the somatostatin receptor 2A expressed in CHO cells. *FEBS Lett.* 516, 124-128.

Breton,B., Lagace,M., and Bouvier,M. (2010). Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the alpha2A-adrenergic receptor, Galphailbeta1gamma2, and GRK2. *FASEB J.* 24, 4733-4743.

Breuiller,M., Tahri-Joutei,A., Ferre,F., and Pointis,G. (1988). Beta-adrenergic receptors and stimulatory effects of (-) isoproterenol on testosterone production in fetal mouse Leydig cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 1454-1460.

Buchanan,F.G., Gorden,D.L., Matta,P., Shi,Q., Matrisian,L.M., and DuBois,R.N. (2006). Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 1492-1497.

Bunemann,M., Frank,M., and Lohse,M.J. (2003). Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 16077-16082.

- Busillo,J.M., Armando,S., Sengupta,R., Meucci,O., Bouvier,M., and Benovic,J.L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 7805-7817.
- Cao,T.T., Deacon,H.W., Reczek,D., Bretscher,A., and von,Z.M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401, 286-290.
- Celver,J., Vishnivetskiy,S.A., Chavkin,C., and Gurevich,V.V. (2002). Conservation of the phosphate-sensitive elements in the arrestin family of proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 9043-9048.
- Charest,P.G., Oligny-Longpre,G., Bonin,H., Azzi,M., and Bouvier,M. (2007). The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cell Signal.* 19, 32-41.
- Charest,P.G., Terrillon,S., and Bouvier,M. (2005). Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep.* 6, 334-340.
- Chen,C.A. and Manning,D.R. (2001). Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* 20, 1643-1652.
- Chen,W., Hu,L.A., Semenov,M.V., Yanagawa,S., Kikuchi,A., Lefkowitz,R.J., and Miller,W.E. (2001). beta-Arrestin1 modulates lymphoid enhancer factor transcriptional activity through interaction with phosphorylated dishevelled proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14889-14894.
- Chen,W., Kirkbride,K.C., How,T., Nelson,C.D., Mo,J., Frederick,J.P., Wang,X.F., Lefkowitz,R.J., and Blobe,G.C. (2003a). Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301, 1394-1397.
- Chen,W., ten,B.D., Brown,J., Ahn,S., Hu,L.A., Miller,W.E., Caron,M.G., Barak,L.S., Nusse,R., and Lefkowitz,R.J. (2003b). Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 301, 1391-1394.
- Cherezov,V., Rosenbaum,D.M., Hanson,M.A., Rasmussen,S.G., Thian,F.S., Kobilka,T.S., Choi,H.J., Kuhn,P., Weis,W.I., Kobilka,B.K., and Stevens,R.C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.
- Cherfils,J. and Chabre,M. (2003). Activation of G-protein Galpha subunits by receptors through Galpha-Gbeta and Galpha-Ggamma interactions. *Trends Biochem. Sci.* 28, 13-17.
- Chidiac,P., Hebert,T.E., Valiquette,M., Dennis,M., and Bouvier,M. (1994). Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* 45, 490-499.

Christopher,J.A., Brown,J., Dore,A.S., Errey,J.C., Koglin,M., Marshall,F.H., Myszka,D.G., Rich,R.L., Tate,C.G., Tehan,B., Warne,T., and Congreve,M. (2013). Biophysical fragment screening of the beta1-adrenergic receptor: identification of high affinity arylpiperazine leads using structure-based drug design. *J. Med. Chem.* 56, 3446-3455.

Chuang,T.T., Paolucci,L., and De,B.A. (1996). Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca²⁺/calmodulin. *J. Biol. Chem.* 271, 28691-28696.

Chung,K.Y., Rasmussen,S.G., Liu,T., Li,S., Devree,B.T., Chae,P.S., Calinski,D., Kobilka,B.K., Woods,V.L., Jr., and Sunahara,R.K. (2011). Conformational changes in the G protein Gs induced by the beta2 adrenergic receptor. *Nature* 477, 611-615.

Chung,S., Funakoshi,T., and Civelli,O. (2008). Orphan GPCR research. *Br. J. Pharmacol.* 153 *Suppl 1*, S339-S346.

Claing,A., Chen,W., Miller,W.E., Vitale,N., Moss,J., Premont,R.T., and Lefkowitz,R.J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 42509-42513.

Clark,A.J. (1926). The reaction between acetyl choline and muscle cells. *J. Physiol.* 61, 530-546.

Coffa,S., Breitman,M., Hanson,S.M., Callaway,K., Kook,S., Dalby,K.N., and Gurevich,V.V. (2011a). The effect of arrestin conformation on the recruitment of c-Raf1, MEK1, and ERK1/2 activation. *PLoS. One.* 6, e28723.

Coffa,S., Breitman,M., Spiller,B.W., and Gurevich,V.V. (2011b). A single mutation in arrestin-2 prevents ERK1/2 activation by reducing c-Raf1 binding. *Biochemistry* 50, 6951-6958.

Coleman,D.E., Berghuis,A.M., Lee,E., Linder,M.E., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1994). Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 265, 1405-1412.

Cong,M., Perry,S.J., Hu,L.A., Hanson,P.I., Claing,A., and Lefkowitz,R.J. (2001a). Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J. Biol. Chem.* 276, 45145-45152.

Cong,M., Perry,S.J., Lin,F.T., Fraser,I.D., Hu,L.A., Chen,W., Pitcher,J.A., Scott,J.D., and Lefkowitz,R.J. (2001b). Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J. Biol. Chem.* 276, 15192-15199.

Conklin,B.R., Farfel,Z., Lustig,K.D., Julius,D., and Bourne,H.R. (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature* 363, 274-276.

Conklin,B.R., Herzmark,P., Ishida,S., Voyno-Yasenetskaya,T.A., Sun,Y., Farfel,Z., and Bourne,H.R. (1996). Carboxyl-terminal mutations of Gq alpha and Gs alpha that alter the fidelity of receptor activation. *Mol. Pharmacol.* 50, 885-890.

Corbel,C., Wang,Q., Bousserouel,H., Hamdi,A., Zhang,B., Lozach,O., Ferandin,Y., Tan,V.B., Gueritte,F., Colas,P., Couturier,C., and Bach,S. (2011). First BRET-based screening assay performed in budding yeast leads to the discovery of CDK5/p25 interaction inhibitors. *Biotechnol. J.* 6, 860-870.

Costa,T. and Herz,A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 7321-7325.

Coulon,V., Audet,M., Homburger,V., Bockaert,J., Fagni,L., Bouvier,M., and Perroy,J. (2008). Subcellular imaging of dynamic protein interactions by bioluminescence resonance energy transfer. *Biophys. J.* 94, 1001-1009.

Currie,K.P. (2010). G protein modulation of CaV2 voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin.)* 4, 497-509.

Daaka,Y., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88-91.

De,A. and Gambhir,S.S. (2005). Noninvasive imaging of protein-protein interactions from live cells and living subjects using bioluminescence resonance energy transfer. *FASEB J.* 19, 2017-2019.

De,A., Loening,A.M., and Gambhir,S.S. (2007). An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res.* 67, 7175-7183.

De,A., Ray,P., Loening,A.M., and Gambhir,S.S. (2009). BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J.* 23, 2702-2709.

De,L.A., Stadel,J.M., and Lefkowitz,R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108-7117.

Defea,K.A. (2011). Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold? *Cell Signal.* 23, 621-629.

Defea,K.A., Vaughn,Z.D., O'Bryan,E.M., Nishijima,D., Dery,O., and Bunnett,N.W. (2000a). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 11086-11091.

Defea,K.A., Zalevsky,J., Thoma,M.S., Dery,O., Mullins,R.D., and Bunnett,N.W. (2000b). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell Biol.* 148, 1267-1281.

DEL,C.J. and KATZ,B. (1957). Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 146, 369-381.

Dhami,G.K., Dale,L.B., Anborgh,P.H., O'Connor-Halligan,K.E., Sterne-Marr,R., and Ferguson,S.S. (2004). G Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 16614-16620.

Dicker,F., Quitterer,U., Winstel,R., Honold,K., and Lohse,M.J. (1999). Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 5476-5481.

Dixon,R.A., Kobilka,B.K., Strader,D.J., Benovic,J.L., Dohlman,H.G., Frielle,T., Bolanowski,M.A., Bennett,C.D., Rands,E., Diehl,R.E., Mumford,R.A., Slater,E.E., Sigal,I.S., Caron,M.G., Lefkowitz,R.J., and Strader,C.D. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75-79.

Downes,G.B. and Gautam,N. (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics* 62, 544-552.

Dragulescu-Andrasi,A., Chan,C.T., De,A., Massoud,T.F., and Gambhir,S.S. (2011). Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 12060-12065.

Dror,R.O., Pan,A.C., Arlow,D.H., Borhani,D.W., Maragakis,P., Shan,Y., Xu,H., and Shaw,D.E. (2011). Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 13118-13123.

Dupre,D.J., Robitaille,M., Rebois,R.V., and Hebert,T.E. (2009). The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 31-56.

Elorza,A., Sarnago,S., and Mayor,F., Jr. (2000). Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol. Pharmacol.* 57, 778-783.

Enjalbert,A. and Bockaert,J. (1983). Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol. Pharmacol.* 23, 576-584.

Ersoy,B.A., Pardo,L., Zhang,S., Thompson,D.A., Millhauser,G., Govaerts,C., and Vaisse,C. (2012). Mechanism of N-terminal modulation of activity at the melanocortin-4 receptor GPCR. *Nat. Chem. Biol.* 8, 725-730.

Esseltine,J.L., Dale,L.B., and Ferguson,S.S. (2011). Rab GTPases bind at a common site within the angiotensin II type I receptor carboxyl-terminal tail: evidence that Rab4 regulates receptor phosphorylation, desensitization, and resensitization. *Mol. Pharmacol.* 79, 175-184.

Etienne-Manneville,S. and Hall,A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

Feierler,J., Wirth,M., Welte,B., Schussler,S., Jochum,M., and Faussner,A. (2011). Helix 8 plays a crucial role in bradykinin B(2) receptor trafficking and signaling. *J. Biol. Chem.* 286, 43282-43293.

Feinstein,T.N., Wehbi,V.L., Ardura,J.A., Wheeler,D.S., Ferrandon,S., Gardella,T.J., and Vilardaga,J.P. (2011). Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat. Chem. Biol.* 7, 278-284.

Feinstein,T.N., Yui,N., Webber,M.J., Wehbi,V.L., Stevenson,H.P., King,J.D., Hallows,K.R., Brown,D., Bouley,R., and Vilardaga,J.P. (2013). Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *J. Biol. Chem.*

Ferguson,S.S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53, 1-24.

Finger,T.E. and Kinnamon,S.C. (2011). Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000. Biol. Rep.* 3, 20.

Foord,S.M., Bonner,T.I., Neubig,R.R., Rosser,E.M., Pin,J.P., Davenport,A.P., Spedding,M., and Harmar,A.J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.* 57, 279-288.

Förster, Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. 437[1], 55-75. 1948. wiley.

Ref Type: Generic

Fraile-Ramos,A., Kohout,T.A., Waldhoer,M., and Marsh,M. (2003). Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway. *Traffic.* 4, 243-253.

Fredriksson,R., Lagerstrom,M.C., Lundin,L.G., and Schioth,H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256-1272.

Freedman,N.J. and Lefkowitz,R.J. (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* 51, 319-351.

Freeman,J.L., De La Cruz,E.M., Pollard,T.D., Lefkowitz,R.J., and Pitcher,J.A. (1998). Regulation of G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) by actin. *J. Biol. Chem.* 273, 20653-20657.

Frielle,T., Collins,S., Daniel,K.W., Caron,M.G., Lefkowitz,R.J., and Kobilka,B.K. (1987). Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 7920-7924.

Frielle,T., Daniel,K.W., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1988). Structural basis of beta-adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric beta 1/beta 2-adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 9494-9498.

Fuhs,S.R. and Insel,P.A. (2011). Caveolin-3 undergoes SUMOylation by the SUMO E3 ligase PIASy: sumoylation affects G-protein-coupled receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 286, 14830-14841.

Fukuhara,S., Chikumi,H., and Gutkind,J.S. (2000). Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho. *FEBS Lett.* 485, 183-188.

Fukuhara,S., Murga,C., Zohar,M., Igishi,T., and Gutkind,J.S. (1999). A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J. Biol. Chem.* 274, 5868-5879.

Fung,B.K. (1983). Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits. *J. Biol. Chem.* 258, 10495-10502.

Gaddum,J.H. (1926). The action of adrenalin and ergotamine on the uterus of the rabbit. *J. Physiol.* 61, 141-150.

Galandrin,S. and Bouvier,M. (2006). Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol. Pharmacol.* 70, 1575-1584.

Galandrin,S., Oligny-Longpre,G., Bonin,H., Ogawa,K., Gales,C., and Bouvier,M. (2008). Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 74, 162-172.

Galandrin,S., Oligny-Longpre,G., and Bouvier,M. (2007). The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 423-430.

Gales,C., Rebois,R.V., Hogue,M., Trieu,P., Breit,A., Hebert,T.E., and Bouvier,M. (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* 2, 177-184.

Gales,C., Van Durm,J.J., Schaak,S., Pontier,S., Percherancier,Y., Audet,M., Paris,H., and Bouvier,M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 778-786.

Gao,H., Sun,Y., Wu,Y., Luan,B., Wang,Y., Qu,B., and Pei,G. (2004). Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol. Cell* 14, 303-317.

Ge,L., Ly,Y., Hollenberg,M., and DeFea,K. (2003). A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 278, 34418-34426.

Gelber,E.I., Kroeze,W.K., Willins,D.L., Gray,J.A., Sinar,C.A., Hyde,E.G., Gurevich,V., Benovic,J., and Roth,B.L. (1999). Structure and function of the third intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor: the third intracellular loop is alpha-helical and binds purified arrestins. *J. Neurochem.* 72, 2206-2214.

Georgieva,T., Devanathan,S., Stropova,D., Park,C.K., Salamon,Z., Tollin,G., Hruby,V.J., Roeske,W.R., Yamamura,H.I., and Varga,E. (2008). Unique agonist-bound cannabinoid CB1 receptor conformations indicate agonist specificity in signaling. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 19-29.

Gesty-Palmer,D., Chen,M., Reiter,E., Ahn,S., Nelson,C.D., Wang,S., Eckhardt,A.E., Cowan,C.L., Spurney,R.F., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 281, 10856-10864.

Gesty-Palmer,D. and Luttrell,L.M. (2008). Heptahelical terpsichory. Who calls the tune? *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 28, 39-58.

Gether,U., Lin,S., and Kobilka,B.K. (1995). Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J. Biol. Chem.* 270, 28268-28275.

Ghanouni,P., Gryczynski,Z., Steenhuis,J.J., Lee,T.W., Farrens,D.L., Lakowicz,J.R., and Kobilka,B.K. (2001). Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 24433-24436.

Gildea,J.J., Israel,J.A., Johnson,A.K., Zhang,J., Jose,P.A., and Felder,R.A. (2009). Caveolin-1 and dopamine-mediated internalization of NaKATPase in human renal proximal tubule cells. *Hypertension* 54, 1070-1076.

Gilman,A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649.

Gines,S., Ciruela,F., Burgueno,J., Casado,V., Canela,E.I., Mallol,J., Lluís,C., and Franco,R. (2001). Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A(1) adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. *Mol. Pharmacol.* 59, 1314-1323.

Giordano,F., Simoes,S., and Raposo,G. (2011). The ocular albinism type 1 (OA1) GPCR is ubiquitinated and its traffic requires endosomal sorting complex responsible for transport (ESCRT) function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 11906-11911.

Girnita,L., Shenoy,S.K., Sehat,B., Vasilcanu,R., Girnita,A., Lefkowitz,R.J., and Larsson,O. (2005). β -Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J. Biol. Chem.* 280, 24412-24419.

Gloerich,M. and Bos,J.L. (2010). Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 355-375.

Gonzalez-Maeso,J., Weisstaub,N.V., Zhou,M., Chan,P., Ivic,L., Ang,R., Lira,A., Bradley-Moore,M., Ge,Y., Zhou,Q., Sealfon,S.C., and Gingrich,J.A. (2007). Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron* 53, 439-452.

Goodman,O.B., Jr., Krupnick,J.G., Santini,F., Gurevich,V.V., Penn,R.B., Gagnon,A.W., Keen,J.H., and Benovic,J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.

Gousseva,V., Simaan,M., Laporte,S.A., and Swain,P.S. (2008). Inferring the lifetime of endosomal protein complexes by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* 94, 679-687.

Gowran,A., Murphy,C.E., and Campbell,V.A. (2009). Delta(9)-tetrahydrocannabinol regulates the p53 post-translational modifiers Murine double minute 2 and the Small Ubiquitin MOdifier protein in the rat brain. *FEBS Lett.* 583, 3412-3418.

Grandoch,M., Roscioni,S.S., and Schmidt,M. (2010). The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *Br. J. Pharmacol.* 159, 265-284.

Granier,S., Kim,S., Shafer,A.M., Ratnala,V.R., Fung,J.J., Zare,R.N., and Kobilka,B. (2007). Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J. Biol. Chem.* 282, 13895-13905.

Granzin,J., Cousin,A., Weirauch,M., Schlesinger,R., Buldt,G., and Batra-Safferling,R. (2012). Crystal structure of p44, a constitutively active splice variant of visual arrestin. *J. Mol. Biol.* 416, 611-618.

Granzin,J., Wilden,U., Choe,H.W., Labahn,J., Krafft,B., and Buldt,G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* 391, 918-921.

Gray-Keller,M.P., Detwiler,P.B., Benovic,J.L., and Gurevich,V.V. (1997). Arrestin with a single amino acid substitution quenches light-activated rhodopsin in a phosphorylation-independent fashion. *Biochemistry* 36, 7058-7063.

Grishina,G. and Berlot,C.H. (2000). A surface-exposed region of G(salpha) in which substitutions decrease receptor-mediated activation and increase receptor affinity. *Mol. Pharmacol.* 57, 1081-1092.

Gullapalli,A., Wolfe,B.L., Griffin,C.T., Magnuson,T., and Trejo,J. (2006). An essential role for SNX1 in lysosomal sorting of protease-activated receptor-1: evidence for retromer-, Hrs-, and Tsg101-independent functions of sorting nexins. *Mol. Biol. Cell* 17, 1228-1238.

Gurevich,E.V., Tesmer,J.J., Mushegian,A., and Gurevich,V.V. (2012). G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol. Ther.* 133, 40-69.

Gurevich,V.V., Dion,S.B., Onorato,J.J., Ptasienski,J., Kim,C.M., Sterne-Marr,R., Hosey,M.M., and Benovic,J.L. (1995). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 720-731.

Gurevich,V.V. and Gurevich,E.V. (2004). The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 105-111.

Gurevich,V.V., Pals-Rylaarsdam,R., Benovic,J.L., Hosey,M.M., and Onorato,J.J. (1997). Agonist-receptor-arrestin, an alternative ternary complex with high agonist affinity. *J. Biol. Chem.* 272, 28849-28852.

Hadcock,J.R., Port,J.D., Gelman,M.S., and Malbon,C.C. (1992). Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of beta 2-adrenergic receptors in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 267, 26017-26022.

Hague,C., Bernstein,L.S., Ramineni,S., Chen,Z., Minneman,K.P., and Hepler,J.R. (2005). Selective inhibition of alpha1A-adrenergic receptor signaling by RGS2 association with the receptor third intracellular loop. *J. Biol. Chem.* 280, 27289-27295.

Hall,M.P., Unch,J., Binkowski,B.F., Valley,M.P., Butler,B.L., Wood,M.G., Otto,P., Zimmerman,K., Vidugiris,G., Machleidt,T., Robers,M.B., Benink,H.A., Eggers,C.T., Slater,M.R., Meisenheimer,P.L., Klaubert,D.H., Fan,F., Encell,L.P., and Wood,K.V. (2012). Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem. Biol.* 7, 1848-1857.

Hamdan,F.F., Audet,M., Garneau,P., Pelletier,J., and Bouvier,M. (2005). High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J. Biomol. Screen.* 10, 463-475.

Hamdan,F.F., Rochdi,M.D., Breton,B., Fessart,D., Michaud,D.E., Charest,P.G., Laporte,S.A., and Bouvier,M. (2007). Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J. Biol. Chem.* 282, 29089-29100.

Hamelin,E., Theriault,C., Laroche,G., and Parent,J.L. (2005). The intracellular trafficking of the G protein-coupled receptor TPbeta depends on a direct interaction with Rab11. *J. Biol. Chem.* 280, 36195-36205.

Hamm,H.E., Deretic,D., Arendt,A., Hargrave,P.A., Koenig,B., and Hofmann,K.P. (1988). Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science* 241, 832-835.

Han,M., Gurevich,V.V., Vishnivetskiy,S.A., Sigler,P.B., and Schubert,C. (2001). Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure.* 9, 869-880.

Hanson,S.M., Francis,D.J., Vishnivetskiy,S.A., Klug,C.S., and Gurevich,V.V. (2006a). Visual arrestin binding to microtubules involves a distinct conformational change. *J. Biol. Chem.* 281, 9765-9772.

Hanson,S.M., Francis,D.J., Vishnivetskiy,S.A., Kolobova,E.A., Hubbell,W.L., Klug,C.S., and Gurevich,V.V. (2006b). Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 4900-4905.

Hanson,S.M. and Gurevich,V.V. (2006). The differential engagement of arrestin surface charges by the various functional forms of the receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 3458-3462.

Hart,M.J., Jiang,X., Kozasa,T., Roscoe,W., Singer,W.D., Gilman,A.G., Sternweis,P.C., and Bollag,G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Gα13. *Science* 280, 2112-2114.

Hasdemir,B., Bunnett,N.W., and Cottrell,G.S. (2007). Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) mediates post-endocytic trafficking of protease-activated receptor 2 and calcitonin receptor-like receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 29646-29657.

Hasdemir,B., Murphy,J.E., Cottrell,G.S., and Bunnett,N.W. (2009). Endosomal deubiquitinating enzymes control ubiquitination and down-regulation of protease-activated receptor 2. *J. Biol. Chem.* 284, 28453-28466.

Hastings,J.W. and Wilson,T. (1976). Bioluminescence and chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.* 23, 461-473.

Hekman,M., Feder,D., Keenan,A.K., Gal,A., Klein,H.W., Pfeuffer,T., Levitzki,A., and Helmreich,E.J. (1984). Reconstitution of beta-adrenergic receptor with components of adenylate cyclase. *EMBO J.* 3, 3339-3345.

Heydorn,A., Sondergaard,B.P., Ersboll,B., Holst,B., Nielsen,F.C., Haft,C.R., Whistler,J., and Schwartz,T.W. (2004a). A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J. Biol. Chem.* 279, 54291-54303.

Heydorn,A., Ward,R.J., Jorgensen,R., Rosenkilde,M.M., Frimurer,T.M., Milligan,G., and Kostenis,E. (2004b). Identification of a novel site within G protein alpha subunits important for specificity of receptor-G protein interaction. *Mol. Pharmacol.* 66, 250-259.

Hirota,C.L., Moreau,F., Iablokov,V., Dicay,M., Renaux,B., Hollenberg,M.D., and MacNaughton,W.K. (2012). Epidermal growth factor receptor transactivation is required for proteinase-activated receptor-2-induced COX-2 expression in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 303, G111-G119.

Hirsch,J.A., Schubert,C., Gurevich,V.V., and Sigler,P.B. (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* 97, 257-269.

Hoенke,C., Bouyssou,T., Tautermann,C.S., Rudolf,K., Schnapp,A., and Konetzki,I. (2009). Use of 5-hydroxy-4H-benzo[1,4]oxazin-3-ones as beta2-adrenoceptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 6640-6644.

Hoөppner,C.Z., Cheng,N., and Ye,R.D. (2012). Identification of a nuclear localization sequence in beta-arrestin-1 and its functional implications. *J. Biol. Chem.* 287, 8932-8943.

Hollenstein,K., Kean,J., Bortolato,A., Cheng,R.K., Dore,A.S., Jazayeri,A., Cooke,R.M., Weir,M., and Marshall,F.H. (2013). Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* 499, 438-443.

Holmes,K.D., Babwah,A.V., Dale,L.B., Poulter,M.O., and Ferguson,S.S. (2006). Differential regulation of corticotropin releasing factor 1alpha receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases. *J. Neurochem.* 96, 934-949.

Hou,Y., Azpiazu,I., Smrcka,A., and Gautam,N. (2000). Selective role of G protein gamma subunits in receptor interaction. *J. Biol. Chem.* 275, 38961-38964.

Hu,C.D., Chinenov,Y., and Kerppola,T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* 9, 789-798.

Huang,J., Chen,S., Zhang,J.J., and Huang,X.Y. (2013). Crystal structure of oligomeric beta1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 419-425.

Huang,Q., Acha,V., Yow,R., Schneider,E., Sardar,D.K., and Hornsby,P.J. (2007). Bioluminescence measurements in mice using a skin window. *J. Biomed. Opt.* 12, 054012.

Hunton,D.L., Barnes,W.G., Kim,J., Ren,X.R., Violin,J.D., Reiter,E., Milligan,G., Patel,D.D., and Lefkowitz,R.J. (2005). Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol. Pharmacol.* 67, 1229-1236.

Hupfeld,C.J., Resnik,J.L., Ugi,S., and Olefsky,J.M. (2005). Insulin-induced beta-arrestin1 Ser-412 phosphorylation is a mechanism for desensitization of ERK activation by Galphai-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 1016-1023.

Hurley,J.H. and Hanson,P.I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 556-566.

Iacovelli,L., Salvatore,L., Capobianco,L., Picascia,A., Barletta,E., Storto,M., Mariggio,S., Sallese,M., Porcellini,A., Nicoletti,F., and De,B.A. (2003). Role of G protein-coupled receptor kinase 4 and beta-arrestin 1 in agonist-stimulated metabotropic glutamate receptor 1 internalization and activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 12433-12442.

Iiri,T., Farfel,Z., and Bourne,H.R. (1998). G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* 394, 35-38.

Inglese,J., Koch,W.J., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1992). Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* 359, 147-150.

Innamorati,G., Le,G.C., Balamotis,M., and Birnbaumer,M. (2001). The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 13096-13103.

Inouye,S. and Shimomura,O. (1997). The use of Renilla luciferase, Oplophorus luciferase, and apoaquorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 349-353.

Janetopoulos,C., Jin,T., and Devreotes,P. (2001). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science* 291, 2408-2411.

Janz,J.M. and Farrens,D.L. (2004). Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus. *J. Biol. Chem.* 279, 29767-29773.

Jares-Erijman,E.A. and Jovin,T.M. (2003). FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* 21, 1387-1395.

Johnson,L.R., Scott,M.G., and Pitcher,J.A. (2004). G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence. *Mol. Cell Biol.* 24, 10169-10179.

Jones,B.W. and Hinkle,P.M. (2008). Arrestin binds to different phosphorylated regions of the thyrotropin-releasing hormone receptor with distinct functional consequences. *Mol. Pharmacol.* 74, 195-202.

- Kang,D.S., Kern,R.C., Puthenveedu,M.A., von,Z.M., Williams,J.C., and Benovic,J.L. (2009). Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* *284*, 29860-29872.
- Kang,J., Shi,Y., Xiang,B., Qu,B., Su,W., Zhu,M., Zhang,M., Bao,G., Wang,F., Zhang,X., Yang,R., Fan,F., Chen,X., Pei,G., and Ma,L. (2005). A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* *123*, 833-847.
- Kara,E., Crepieux,P., Gauthier,C., Martinat,N., Piketty,V., Guillou,F., and Reiter,E. (2006). A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol. Endocrinol.* *20*, 3014-3026.
- Karlin,A. (1967). On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *J. Theor. Biol.* *16*, 306-320.
- Kelly,P., Casey,P.J., and Meigs,T.E. (2007). Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric g proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry* *46*, 6677-6687.
- Kenakin,T. (2004). Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 186-192.
- Kenakin,T., Watson,C., Muniz-Medina,V., Christopoulos,A., and Novick,S. (2012). A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem. Neurosci.* *3*, 193-203.
- Key,T.A., Bennett,T.A., Foutz,T.D., Gurevich,V.V., Sklar,L.A., and Prossnitz,E.R. (2001). Regulation of formyl peptide receptor agonist affinity by reconstitution with arrestins and heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* *276*, 49204-49212.
- Kim,I.M., Tilley,D.G., Chen,J., Salazar,N.C., Whalen,E.J., Violin,J.D., and Rockman,H.A. (2008). Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 14555-14560.
- Kim,J., Ahn,S., Ren,X.R., Whalen,E.J., Reiter,E., Wei,H., and Lefkowitz,R.J. (2005). Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 1442-1447.
- Kim,Y.J., Hofmann,K.P., Ernst,O.P., Scheerer,P., Choe,H.W., and Sommer,M.E. (2013). Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature* *497*, 142-146.
- Kim,Y.M., Barak,L.S., Caron,M.G., and Benovic,J.L. (2002). Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* *277*, 16837-16846.
- Kim,Y.P., Jin,Z., Kim,E., Park,S., Oh,Y.H., and Kim,H.S. (2009). Analysis of in vitro SUMOylation using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *382*, 530-534.

Kinnamon,S.C. (2012). Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 158-168.

Kisseberth,W.C., Brettingen,N.T., Lohse,J.K., and Sandgren,E.P. (1999). Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. *Dev. Biol.* 214, 128-138.

Kisselev,O.G. and Downs,M.A. (2006). Rhodopsin-interacting surface of the transducin gamma subunit. *Biochemistry* 45, 9386-9392.

Kisselev,O.G., Downs,M.A., McDowell,J.H., and Hargrave,P.A. (2004a). Conformational changes in the phosphorylated C-terminal domain of rhodopsin during rhodopsin arrestin interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 51203-51207.

Kisselev,O.G., McDowell,J.H., and Hargrave,P.A. (2004b). The arrestin-bound conformation and dynamics of the phosphorylated carboxy-terminal region of rhodopsin. *FEBS Lett.* 564, 307-311.

Kobilka,B.K., Dixon,R.A., Frielle,T., Dohlman,H.G., Bolanowski,M.A., Sigal,I.S., Yang-Feng,T.L., Francke,U., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1987a). cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 46-50.

Kobilka,B.K., Matsui,H., Kobilka,T.S., Yang-Feng,T.L., Francke,U., Caron,M.G., Lefkowitz,R.J., and Regan,J.W. (1987b). Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238, 650-656.

Kohout,T.A., Lin,F.S., Perry,S.J., Conner,D.A., and Lefkowitz,R.J. (2001). beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 1601-1606.

Kong,M.M., Hasbi,A., Mattocks,M., Fan,T., O'Dowd,B.F., and George,S.R. (2007). Regulation of D1 dopamine receptor trafficking and signaling by caveolin-1. *Mol. Pharmacol.* 72, 1157-1170.

Kostenis,E., Conklin,B.R., and Wess,J. (1997a). Molecular basis of receptor/G protein coupling selectivity studied by coexpression of wild type and mutant m2 muscarinic receptors with mutant G alpha(q) subunits. *Biochemistry* 36, 1487-1495.

Kostenis,E., Degtyarev,M.Y., Conklin,B.R., and Wess,J. (1997b). The N-terminal extension of Galphaq is critical for constraining the selectivity of receptor coupling. *J. Biol. Chem.* 272, 19107-19110.

Kostenis,E., Gomeza,J., Lerche,C., and Wess,J. (1997c). Genetic analysis of receptor-Galphaq coupling selectivity. *J. Biol. Chem.* 272, 23675-23681.

Kostenis,E., Zeng,F.Y., and Wess,J. (1998). Functional characterization of a series of mutant G protein α subunits displaying promiscuous receptor coupling properties. *J. Biol. Chem.* 273, 17886-17892.

Kovoor,A., Celver,J., Abdryashitov,R.I., Chavkin,C., and Gurevich,V.V. (1999). Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6831-6834.

Krasel,C., Bunemann,M., Lorenz,K., and Lohse,M.J. (2005). Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J. Biol. Chem.* 280, 9528-9535.

Krasel,C., Zabel,U., Lorenz,K., Reiner,S., Al-Sabah,S., and Lohse,M.J. (2008). Dual role of the beta2-adrenergic receptor C terminus for the binding of beta-arrestin and receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 283, 31840-31848.

Krilov,L., Nguyen,A., Miyazaki,T., Unson,C.G., and Bouscarel,B. (2008). Glucagon receptor recycling: role of carboxyl terminus, beta-arrestins, and cytoskeleton. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 295, C1230-C1237.

Krueger,K.M., Daaka,Y., Pitcher,J.A., and Lefkowitz,R.J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J. Biol. Chem.* 272, 5-8.

Krugmann,S., Hawkins,P.T., Pryer,N., and Braselmann,S. (1999). Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* 274, 17152-17158.

Kruk,J.S., Vasefi,M.S., Liu,H., Heikkila,J.J., and Beazely,M.A. (2013). 5-HT(1A) receptors transactivate the platelet-derived growth factor receptor type beta in neuronal cells. *Cell Signal.* 25, 133-143.

Krupnick,J.G., Goodman,O.B., Jr., Keen,J.H., and Benovic,J.L. (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J. Biol. Chem.* 272, 15011-15016.

Kunishima,N., Shimada,Y., Tsuji,Y., Sato,T., Yamamoto,M., Kumasaka,T., Nakanishi,S., Jingami,H., and Morikawa,K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971-977.

Kurose,H. (2003). α 12 and α 13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci.* 74, 155-161.

Lagerstrom,M.C. and Schioth,H.B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 339-357.

Lakshmikanthan,V., Zou,L., Kim,J.I., Michal,A., Nie,Z., Messias,N.C., Benovic,J.L., and Daaka,Y. (2009). Identification of betaArrestin2 as a corepressor of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 9379-9384.

Lambright,D.G., Noel,J.P., Hamm,H.E., and Sigler,P.B. (1994). Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369, 621-628.

Lambright,D.G., Sondek,J., Bohm,A., Skiba,N.P., Hamm,H.E., and Sigler,P.B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311-319.

Lan,H., Teeter,M.M., Gurevich,V.V., and Neve,K.A. (2009). An intracellular loop 2 amino acid residue determines differential binding of arrestin to the dopamine D2 and D3 receptors. *Mol. Pharmacol.* 75, 19-26.

Lander,E.S., Linton,L.M., Birren,B., Nusbaum,C., Zody,M.C., Baldwin,J., Devon,K., Dewar,K., Doyle,M., FitzHugh,W., Funke,R., Gage,D., Harris,K., Heaford,A., Howland,J., Kann,L., Lehoczy,J., LeVine,R., McEwan,P., McKernan,K., Meldrim,J., Mesirov,J.P., Miranda,C., Morris,W., Naylor,J., Raymond,C., Rosetti,M., Santos,R., Sheridan,A., Sougnez,C., Stange-Thomann,N., Stojanovic,N., Subramanian,A., Wyman,D., Rogers,J., Sulston,J., Ainscough,R., Beck,S., Bentley,D., Burton,J., Clee,C., Carter,N., Coulson,A., Deadman,R., Deloukas,P., Dunham,A., Dunham,I., Durbin,R., French,L., Grafham,D., Gregory,S., Hubbard,T., Humphray,S., Hunt,A., Jones,M., Lloyd,C., McMurray,A., Matthews,L., Mercer,S., Milne,S., Mullikin,J.C., Mungall,A., Plumb,R., Ross,M., Shownkeen,R., Sims,S., Waterston,R.H., Wilson,R.K., Hillier,L.W., McPherson,J.D., Marra,M.A., Mardis,E.R., Fulton,L.A., Chinwalla,A.T., Pepin,K.H., Gish,W.R., Chisoe,S.L., Wendl,M.C., Delehaunty,K.D., Miner,T.L., Delehaunty,A., Kramer,J.B., Cook,L.L., Fulton,R.S., Johnson,D.L., Minx,P.J., Clifton,S.W., Hawkins,T., Branscomb,E., Predki,P., Richardson,P., Wenning,S., Slezak,T., Doggett,N., Cheng,J.F., Olsen,A., Lucas,S., Elkin,C., Uberbacher,E., Frazier,M., Gibbs,R.A., Muzny,D.M., Scherer,S.E., Bouck,J.B., Sodergren,E.J., Worley,K.C., Rives,C.M., Gorrell,J.H., Metzker,M.L., Naylor,S.L., Kucherlapati,R.S., Nelson,D.L., Weinstock,G.M., Sakaki,Y., Fujiyama,A., Hattori,M., Yada,T., Toyoda,A., Itoh,T., Kawagoe,C., Watanabe,H., Totoki,Y., Taylor,T., Weissenbach,J., Heilig,R., Saurin,W., Artiguenave,F., Brottier,P., Bruls,T., Pelletier,E., Robert,C., Wincker,P., Smith,D.R., Doucette-Stamm,L., Rubenfield,M., Weinstock,K., Lee,H.M., Dubois,J., Rosenthal,A., Platzer,M., Nyakatura,G., Taudien,S., Rump,A., Yang,H., Yu,J., Wang,J., Huang,G., Gu,J., Hood,L., Rowen,L., Madan,A., Qin,S., Davis,R.W., Federspiel,N.A., Abola,A.P., Proctor,M.J., Myers,R.M., Schmutz,J., Dickson,M., Grimwood,J., Cox,D.R., Olson,M.V., Kaul,R., Raymond,C., Shimizu,N., Kawasaki,K., Minoshima,S., Evans,G.A., Athanasiou,M., Schultz,R., Roe,B.A., Chen,F., Pan,H., Ramser,J., Lehrach,H., Reinhardt,R., McCombie,W.R., de la Bastide,M., Dedhia,N., Blocker,H., Hornischer,K., Nordsiek,G., Agarwala,R., Aravind,L., Bailey,J.A., Bateman,A., Batzoglou,S., Birney,E., Bork,P., Brown,D.G., Burge,C.B., Cerutti,L., Chen,H.C., Church,D., Clamp,M., Copley,R.R., Doerks,T., Eddy,S.R., Eichler,E.E., Furey,T.S., Galagan,J., Gilbert,J.G., Harmon,C., Hayashizaki,Y., Haussler,D., Hermjakob,H., Hokamp,K., Jang,W., Johnson,L.S., Jones,T.A., Kasif,S., Kasprzyk,A., Kennedy,S., Kent,W.J., Kitts,P., Koonin,E.V., Korf,I., Kulp,D., Lancet,D., Lowe,T.M., McLysaght,A., Mikkelsen,T., Moran,J.V., Mulder,N., Pollara,V.J.,

Ponting,C.P., Schuler,G., Schultz,J., Slater,G., Smit,A.F., Stupka,E., Szustakowski,J., Thierry-Mieg,D., Thierry-Mieg,J., Wagner,L., Wallis,J., Wheeler,R., Williams,A., Wolf,Y.I., Wolfe,K.H., Yang,S.P., Yeh,R.F., Collins,F., Guyer,M.S., Peterson,J., Felsenfeld,A., Wetterstrand,K.A., Patrinos,A., Morgan,M.J., de,J.P., Catanese,J.J., Osoegawa,K., Shizuya,H., Choi,S., and Chen,Y.J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Laporte,S.A., Oakley,R.H., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (2000). The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 275, 23120-23126.

Laporte,S.A., Oakley,R.H., Zhang,J., Holt,J.A., Ferguson,S.S., Caron,M.G., and Barak,L.S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3712-3717.

Lee,C.H., Katz,A., and Simon,M.I. (1995). Multiple regions of G alpha 16 contribute to the specificity of activation by the C5a receptor. *Mol. Pharmacol.* 47, 218-223.

Leff,P. (1995). The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 89-97.

Lefkowitz,R.J., Kobilka,B.K., Benovic,J.L., Bouvier,M., Cotecchia,S., Hausdorff,W.P., Dohlgan,H.G., Regan,J.W., and Caron,M.G. (1988). Molecular biology of adrenergic receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 53 Pt 1, 507-514.

Lefkowitz,R.J. and Shenoy,S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517.

Lembo,P.M., Ghahremani,M.H., and Albert,P.R. (1999). Receptor selectivity of the cloned opossum G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in intact opossum kidney cells: role in desensitization of endogenous alpha2C-adrenergic but not serotonin 1B receptors. *Mol. Endocrinol.* 13, 138-147.

Leopoldt,D., Hanck,T., Exner,T., Maier,U., Wetzker,R., and Nurnberg,B. (1998). Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 7024-7029.

Li,J.G., Benovic,J.L., and Liu-Chen,L.Y. (2000). Mechanisms of agonist-induced down-regulation of the human kappa-opioid receptor: internalization is required for down-regulation. *Mol. Pharmacol.* 58, 795-801.

Li,Q. and Muma,N.A. (2013). Estradiol potentiates 8-OH-DPAT-induced sumoylation of 5-HT receptor: Characterization and subcellular distribution of sumoylated 5-HT receptors. *Psychoneuroendocrinology*.

Li,X., Baillie,G.S., and Houslay,M.D. (2009a). Mdm2 directs the ubiquitination of beta-arrestin-sequestered cAMP phosphodiesterase-4D5. *J. Biol. Chem.* 284, 16170-16182.

Li,X., MacLeod,R., Dunlop,A.J., Edwards,H.V., Advant,N., Gibson,L.C., Devine,N.M., Brown,K.M., Adams,D.R., Houslay,M.D., and Baillie,G.S. (2009b). A scanning peptide array approach uncovers association sites within the JNK/beta arrestin signalling complex. *FEBS Lett.* 583, 3310-3316.

Liapakis,G., Ballesteros,J.A., Papachristou,S., Chan,W.C., Chen,X., and Javitch,J.A. (2000). The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 37779-37788.

Liggett,S.B. and Raymond,J.R. (1993). Pharmacology and molecular biology of adrenergic receptors. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab* 7, 279-306.

Limbird,L.E. and Lefkowitz,R.J. (1978). Agonist-induced increase in apparent beta-adrenergic receptor size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 228-232.

Lin,F., Wang,H., and Malbon,C.C. (2000). Gravin-mediated formation of signaling complexes in beta 2-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *J. Biol. Chem.* 275, 19025-19034.

Lin,F.T., Chen,W., Shenoy,S., Cong,M., Exum,S.T., and Lefkowitz,R.J. (2002). Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* 41, 10692-10699.

Lin,F.T., Daaka,Y., and Lefkowitz,R.J. (1998). beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 31640-31643.

Lin,F.T., Krueger,K.M., Kendall,H.E., Daaka,Y., Fredericks,Z.L., Pitcher,J.A., and Lefkowitz,R.J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J. Biol. Chem.* 272, 31051-31057.

Lin,F.T., Miller,W.E., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (1999). Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 15971-15974.

Lipsky,R., Potts,E.M., Tarzami,S.T., Puckerin,A.A., Stocks,J., Schecter,A.D., Sobie,E.A., Akar,F.G., and Diverse-Pierluissi,M.A. (2008). beta-Adrenergic receptor activation induces internalization of cardiac Cav1.2 channel complexes through a beta-arrestin 1-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 283, 17221-17226.

Liu,Q., Dewi,D.A., Liu,W., Bee,M.S., and Schonbrunn,A. (2008). Distinct phosphorylation sites in the SST2A somatostatin receptor control internalization, desensitization, and arrestin binding. *Mol. Pharmacol.* 73, 292-304.

Liu,W., Chun,E., Thompson,A.A., Chubukov,P., Xu,F., Katritch,V., Han,G.W., Roth,C.B., Heitman,L.H., Ijzerman,A.P., Cherezov,V., and Stevens,R.C. (2012). Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* 337, 232-236.

Lodowski,D.T., Pitcher,J.A., Capel,W.D., Lefkowitz,R.J., and Tesmer,J.J. (2003). Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* 300, 1256-1262.

Loening,A.M., Fenn,T.D., Wu,A.M., and Gambhir,S.S. (2006). Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel* 19, 391-400.

Lohse,M.J., Andexinger,S., Pitcher,J., Trukawinski,S., Codina,J., Faure,J.P., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1992). Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* 267, 8558-8564.

Lohse,M.J., Benovic,J.L., Codina,J., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550.

Lohse,M.J., Lefkowitz,R.J., Caron,M.G., and Benovic,J.L. (1989). Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 3011-3015.

Luan,B., Zhang,Z., Wu,Y., Kang,J., and Pei,G. (2005). Beta-arrestin2 functions as a phosphorylation-regulated suppressor of UV-induced NF-kappaB activation. *EMBO J.* 24, 4237-4246.

Luan,B., Zhao,J., Wu,H., Duan,B., Shu,G., Wang,X., Li,D., Jia,W., Kang,J., and Pei,G. (2009). Deficiency of a beta-arrestin-2 signal complex contributes to insulin resistance. *Nature* 457, 1146-1149.

Luttrell,L.M. (2008). Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol. Biotechnol.* 39, 239-264.

Luttrell,L.M., Ferguson,S.S., Daaka,Y., Miller,W.E., Maudsley,S., Della Rocca,G.J., Lin,F., Kawakatsu,H., Owada,K., Luttrell,D.K., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661.

Luttrell,L.M. and Gesty-Palmer,D. (2010). Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol. Rev.* 62, 305-330.

Luttrell,L.M., Roudabush,F.L., Choy,E.W., Miller,W.E., Field,M.E., Pierce,K.L., and Lefkowitz,R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2449-2454.

Lutz,S., Freichel-Blomquist,A., Yang,Y., Rumenapp,U., Jakobs,K.H., Schmidt,M., and Wieland,T. (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* 280, 11134-11139.

Lutz,S., Shankaranarayanan,A., Coco,C., Ridilla,M., Nance,M.R., Vettel,C., Baltus,D., Evelyn,C.R., Neubig,R.R., Wieland,T., and Tesmer,J.J. (2007). Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* 318, 1923-1927.

Machin,P.J., Hurst,D.N., Bradshaw,R.M., Blaber,L.C., Burden,D.T., Fryer,A.D., Melarange,R.A., and Shivdasani,C. (1983). beta 1-selective adrenoceptor antagonists. 2. 4-ether-linked phenoxypropanolamines. *J. Med. Chem.* 26, 1570-1576.

Magalhaes,A.C., Dunn,H., and Ferguson,S.S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1717-1736.

Mahabaleshwar,H., Tarbashevich,K., Nowak,M., Brand,M., and Raz,E. (2012). beta-arrestin control of late endosomal sorting facilitates decoy receptor function and chemokine gradient formation. *Development* 139, 2897-2902.

Marchese,A., Raiborg,C., Santini,F., Keen,J.H., Stenmark,H., and Benovic,J.L. (2003). The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev. Cell* 5, 709-722.

Marion,S., Fralish,G.B., Laporte,S., Caron,M.G., and Barak,L.S. (2007). N-terminal tyrosine modulation of the endocytic adaptor function of the beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* 282, 18937-18944.

Marion,S., Kara,E., Crepieux,P., Piketty,V., Martinat,N., Guillou,F., and Reiter,E. (2006). G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestins are recruited to FSH receptor in stimulated rat primary Sertoli cells. *J. Endocrinol.* 190, 341-350.

Martin,N.P., Lefkowitz,R.J., and Shenoy,S.K. (2003). Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 278, 45954-45959.

Martin,N.P., Whalen,E.J., Zamah,M.A., Pierce,K.L., and Lefkowitz,R.J. (2004). PKA-mediated phosphorylation of the beta1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. *Cell Signal.* 16, 1397-1403.

Martini,J.S., Raake,P., Vinge,L.E., DeGeorge,B.R., Jr., Chuprun,J.K., Harris,D.M., Gao,E., Eckhart,A.D., Pitcher,J.A., and Koch,W.J. (2008). Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 12457-12462.

Martini,L., Hastrup,H., Holst,B., Fraile-Ramos,A., Marsh,M., and Schwartz,T.W. (2002). NK1 receptor fused to beta-arrestin displays a single-component, high-affinity molecular phenotype. *Mol. Pharmacol.* 62, 30-37.

Maudsley,S., Pierce,K.L., Zamah,A.M., Miller,W.E., Ahn,S., Daaka,Y., Lefkowitz,R.J., and Luttrell,L.M. (2000). The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated

kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 9572-9580.

McDonald,P.H., Chow,C.W., Miller,W.E., Laporte,S.A., Field,M.E., Lin,F.T., Davis,R.J., and Lefkowitz,R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-1577.

McIntire,W.E., MacCleery,G., and Garrison,J.C. (2001). The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 15801-15809.

McKnight,A.J. and Gordon,S. (1998). The EGF-TM7 family: unusual structures at the leukocyte surface. *J. Leukoc. Biol.* 63, 271-280.

McLaughlin,J.N., Shen,L., Holinstat,M., Brooks,J.D., Dibenedetto,E., and Hamm,H.E. (2005). Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.* 280, 25048-25059.

Meng,D., Lynch,M.J., Huston,E., Beyermann,M., Eichhorst,J., Adams,D.R., Klusmann,E., Houslay,M.D., and Baillie,G.S. (2009). MEK1 binds directly to betaarrestin1, influencing both its phosphorylation by ERK and the timing of its isoprenaline-stimulated internalization. *J. Biol. Chem.* 284, 11425-11435.

Meresse,S., Gorvel,J.P., and Chavrier,P. (1995). The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 11), 3349-3358.

Micheline,E., Mirasoli,M., Karp,M., Virta,M., and Roda,A. (2004). Development of a bioluminescence resonance energy-transfer assay for estrogen-like compound in vivo monitoring. *Anal. Chem.* 76, 7069-7076.

Milano,S.K., Kim,Y.M., Stefano,F.P., Benovic,J.L., and Brenner,C. (2006). Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J. Biol. Chem.* 281, 9812-9823.

Milano,S.K., Pace,H.C., Kim,Y.M., Brenner,C., and Benovic,J.L. (2002). Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* 41, 3321-3328.

Miller,W.E., Maudsley,S., Ahn,S., Khan,K.D., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (2000). beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 275, 11312-11319.

Miller,W.E., McDonald,P.H., Cai,S.F., Field,M.E., Davis,R.J., and Lefkowitz,R.J. (2001). Identification of a motif in the carboxyl terminus of beta -arrestin2 responsible for activation of JNK3. *J. Biol. Chem.* 276, 27770-27777.

Mixon,M.B., Lee,E., Coleman,D.E., Berghuis,A.M., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1995). Tertiary and quaternary structural changes in Gi alpha 1 induced by GTP hydrolysis. *Science* 270, 954-960.

Mizuno,N. and Itoh,H. (2009). Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals*. 17, 42-54.

Mo,W., Zhang,L., Yang,G., Zhai,J., Hu,Z., Chen,Y., Chen,X., Hui,L., Huang,R., and Hu,G. (2008). Nuclear beta-arrestin1 functions as a scaffold for the dephosphorylation of STAT1 and moderates the antiviral activity of IFN-gamma. *Mol. Cell* 31, 695-707.

MONOD,J., WYMAN,J., and CHANGEUX,J.P. (1965). ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *J. Mol. Biol.* 12:88-118., 88-118.

Morris,A.J. and Scarlata,S. (1997). Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes. *Biochem. Pharmacol.* 54, 429-435.

Moutin,E., Raynaud,F., Fagni,L., and Perroy,J. (2012a). GKAP-DLC2 interaction organizes the postsynaptic scaffold complex to enhance synaptic NMDA receptor activity. *J. Cell Sci.* 125, 2030-2040.

Moutin,E., Raynaud,F., Roger,J., Pellegrino,E., Homburger,V., Bertaso,F., Ollendorff,V., Bockaert,J., Fagni,L., and Perroy,J. (2012b). Dynamic remodeling of scaffold interactions in dendritic spines controls synaptic excitability. *J. Cell Biol.* 198, 251-263.

Mukhopadhyay,S. and Howlett,A.C. (2005). Chemically distinct ligands promote differential CB1 cannabinoid receptor-Gi protein interactions. *Mol. Pharmacol.* 67, 2016-2024.

Murphy,J.E., Roosterman,D., Cottrell,G.S., Padilla,B.E., Feld,M., Brand,E., Cedron,W.J., Bunnett,N.W., and Steinhoff,M. (2011). Protein phosphatase 2A mediates resensitization of the neurokinin 1 receptor. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 301, C780-C791.

Natochin,M., Muradov,K.G., McEntaffer,R.L., and Artemyev,N.O. (2000). Rhodopsin recognition by mutant G(s)alpha containing C-terminal residues of transducin. *J. Biol. Chem.* 275, 2669-2675.

Nelson,C.D., Perry,S.J., Regier,D.S., Prescott,S.M., Topham,M.K., and Lefkowitz,R.J. (2007). Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science* 315, 663-666.

Neubert,T.A., Johnson,R.S., Hurley,J.B., and Walsh,K.A. (1992). The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. *J. Biol. Chem.* 267, 18274-18277.

Neubig,R.R., Spedding,M., Kenakin,T., and Christopoulos,A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 55, 597-606.

- Neuhaus,E.M., Mashukova,A., Barbour,J., Wolters,D., and Hatt,H. (2006). Novel function of beta-arrestin2 in the nucleus of mature spermatozoa. *J. Cell Sci.* *119*, 3047-3056.
- Nobles,K.N., Guan,Z., Xiao,K., Oas,T.G., and Lefkowitz,R.J. (2007). The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins1 and -2. *J. Biol. Chem.* *282*, 21370-21381.
- Nobles,K.N., Xiao,K., Ahn,S., Shukla,A.K., Lam,C.M., Rajagopal,S., Strachan,R.T., Huang,T.Y., Bressler,E.A., Hara,M.R., Shenoy,S.K., Gygi,S.P., and Lefkowitz,R.J. (2011). Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci. Signal.* *4*, ra51.
- Noel,J.P., Hamm,H.E., and Sigler,P.B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP gamma S. *Nature* *366*, 654-663.
- Noma,T., Lemaire,A., Naga Prasad,S.V., Barki-Harrington,L., Tilley,D.G., Chen,J., Le,C.P., Violin,J.D., Wei,H., Lefkowitz,R.J., and Rockman,H.A. (2007). Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J. Clin. Invest* *117*, 2445-2458.
- Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J. Biol. Chem.* *276*, 19452-19460.
- Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Caron,M.G., and Barak,L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* *275*, 17201-17210.
- Oldham,W.M. and Hamm,H.E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q. Rev. Biophys.* *39*, 117-166.
- Oligny-Longpre,G., Corbani,M., Zhou,J., Hogue,M., Guillon,G., and Bouvier,M. (2012). Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *109*, E1028-E1037.
- Onaran,H.O. and Costa,T. (1997). Agonist efficacy and allosteric models of receptor action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *812*, 98-115.
- Onaran,H.O. and Costa,T. (2009). Allosteric coupling and conformational fluctuations in proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* *10*, 110-115.
- Onrust,R., Herzmark,P., Chi,P., Garcia,P.D., Lichtarge,O., Kingsley,C., and Bourne,H.R. (1997). Receptor and betagamma binding sites in the alpha subunit of the retinal G protein transducin. *Science* *275*, 381-384.

Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 993-996.

Ozawa, K., Whalen, E.J., Nelson, C.D., Mu, Y., Hess, D.T., Lefkowitz, R.J., and Stamler, J.S. (2008). S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol. Cell* 31, 395-405.

Paing, M.M., Stutts, A.B., Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J., and Trejo, J. (2002). beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J. Biol. Chem.* 277, 1292-1300.

Palczewski, K., Buczylo, J., Imami, N.R., McDowell, J.H., and Hargrave, P.A. (1991). Role of the carboxyl-terminal region of arrestin in binding to phosphorylated rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 266, 15334-15339.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le, T., I, Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.

Parent, A., Hamelin, E., Germain, P., and Parent, J.L. (2009). Rab11 regulates the recycling of the beta2-adrenergic receptor through a direct interaction. *Biochem. J.* 418, 163-172.

Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183.

Peleg, G., Ghanouni, P., Kobilka, B.K., and Zare, R.N. (2001). Single-molecule spectroscopy of the beta(2) adrenergic receptor: observation of conformational substates in a membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8469-8474.

Pellissier, L.P., Sallander, J., Campillo, M., Gaven, F., Queffeuilou, E., Pillot, M., Dumuis, A., Claeysen, S., Bockaert, J., and Pardo, L. (2009). Conformational toggle switches implicated in basal constitutive and agonist-induced activated states of 5-hydroxytryptamine-4 receptors. *Mol. Pharmacol.* 75, 982-990.

Penela, P., Rivas, V., Salcedo, A., and Mayor, F., Jr. (2010). G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) modulation and cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 1118-1123.

Perez, D.M., Hwa, J., Gaivin, R., Mathur, M., Brown, F., and Graham, R.M. (1996). Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor. *Mol. Pharmacol.* 49, 112-122.

Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., and Bouvier, M. (2003). Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* 22, 3816-3824.

Perry,S.J., Baillie,G.S., Kohout,T.A., McPhee,I., Magiera,M.M., Ang,K.L., Miller,W.E., McLean,A.J., Conti,M., Houslay,M.D., and Lefkowitz,R.J. (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* 298, 834-836.

Pitcher,J., Lohse,M.J., Codina,J., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1992). Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry* 31, 3193-3197.

Pitcher,J.A., Touhara,K., Payne,E.S., and Lefkowitz,R.J. (1995). Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* 270, 11707-11710.

Pluder,F., Morl,K., and Beck-Sickinger,A.G. (2006). Proteome analysis to study signal transduction of G protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 112, 1-11.

Por,E.D., Gomez,R., Akopian,A.N., and Jeske,N.A. (2013). Phosphorylation regulates TRPV1 association with beta-arrestin-2. *Biochem. J.* 451, 101-109.

Povsic,T.J., Kohout,T.A., and Lefkowitz,R.J. (2003). Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 51334-51339.

Premont,R.T., Claing,A., Vitale,N., Freeman,J.L., Pitcher,J.A., Patton,W.A., Moss,J., Vaughan,M., and Lefkowitz,R.J. (1998). beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14082-14087.

Premont,R.T., Koch,W.J., Inglese,J., and Lefkowitz,R.J. (1994). Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 269, 6832-6841.

Premont,R.T., Macrae,A.D., Stoffel,R.H., Chung,N., Pitcher,J.A., Ambrose,C., Inglese,J., MacDonald,M.E., and Lefkowitz,R.J. (1996). Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J. Biol. Chem.* 271, 6403-6410.

Prenzel,N., Zwick,E., Daub,H., Leserer,M., Abraham,R., Wallasch,C., and Ullrich,A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884-888.

Pronin,A.N. and Benovic,J.L. (1997). Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272, 3806-3812.

Quack,I., Rump,L.C., Gerke,P., Walther,I., Vinke,T., Vonend,O., Grunwald,T., and Sellin,L. (2006). beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 14110-14115.

Raehal,K.M., Walker,J.K., and Bohn,L.M. (2005). Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *314*, 1195-1201.

Rajagopal,K., Whalen,E.J., Violin,J.D., Stiber,J.A., Rosenberg,P.B., Premont,R.T., Coffman,T.M., Rockman,H.A., and Lefkowitz,R.J. (2006). Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 16284-16289.

Rapacciuolo,A., Suvarna,S., Barki-Harrington,L., Luttrell,L.M., Cong,M., Lefkowitz,R.J., and Rockman,H.A. (2003). Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J. Biol. Chem.* *278*, 35403-35411.

Rasmussen,S.G., Choi,H.J., Fung,J.J., Pardon,E., Casarosa,P., Chae,P.S., Devree,B.T., Rosenbaum,D.M., Thian,F.S., Kobilka,T.S., Schnapp,A., Konetzki,I., Sunahara,R.K., Gellman,S.H., Pautsch,A., Steyaert,J., Weis,W.I., and Kobilka,B.K. (2011a). Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* *469*, 175-180.

Rasmussen,S.G., Choi,H.J., Rosenbaum,D.M., Kobilka,T.S., Thian,F.S., Edwards,P.C., Burghammer,M., Ratnala,V.R., Sanishvili,R., Fischetti,R.F., Schertler,G.F., Weis,W.I., and Kobilka,B.K. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* *450*, 383-387.

Rasmussen,S.G., Devree,B.T., Zou,Y., Kruse,A.C., Chung,K.Y., Kobilka,T.S., Thian,F.S., Chae,P.S., Pardon,E., Calinski,D., Mathiesen,J.M., Shah,S.T., Lyons,J.A., Caffrey,M., Gellman,S.H., Steyaert,J., Skinotis,G., Weis,W.I., Sunahara,R.K., and Kobilka,B.K. (2011b). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* *477*, 549-555.

Reiter,E., Marion,S., Robert,F., Troispoux,C., Boulay,F., Guillou,F., and Crepieux,P. (2001). Kinase-inactive G-protein-coupled receptor kinases are able to attenuate follicle-stimulating hormone-induced signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *282*, 71-78.

Ren,M., Xu,G., Zeng,J., De Lemos-Chiarandini,C., Adesnik,M., and Sabatini,D.D. (1998). Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 6187-6192.

Ren,X.R., Reiter,E., Ahn,S., Kim,J., Chen,W., and Lefkowitz,R.J. (2005). Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 1448-1453.

Ridge,K.D., Abdulaev,N.G., Sousa,M., and Palczewski,K. (2003). Phototransduction: crystal clear. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 479-487.

Ritter,S.L. and Hall,R.A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 819-830.

Rodriguez-Munoz,M., Bermudez,D., Sanchez-Blazquez,P., and Garzon,J. (2007). Sumoylated RGS-Rz proteins act as scaffolds for Mu-opioid receptors and G-protein complexes in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32, 842-850.

Rojas,R.J., Yohe,M.E., Gershburg,S., Kawano,T., Kozasa,T., and Sondek,J. (2007). Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J. Biol. Chem.* 282, 29201-29210.

Rondard,P., Iiri,T., Srinivasan,S., Meng,E., Fujita,T., and Bourne,H.R. (2001). Mutant G protein alpha subunit activated by Gbeta gamma: a model for receptor activation? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6150-6155.

Rosenbaum,D.M., Cherezov,V., Hanson,M.A., Rasmussen,S.G., Thian,F.S., Kobilka,T.S., Choi,H.J., Yao,X.J., Weis,W.I., Stevens,R.C., and Kobilka,B.K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318, 1266-1273.

Ross,E.M., Maguire,M.E., Sturgill,T.W., Biltonen,R.L., and Gilman,A.G. (1977). Relationship between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 252, 5761-5775.

Salcedo,A., Mayor,F., Jr., and Penela,P. (2006). Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *EMBO J.* 25, 4752-4762.

Sallese,M., Mariggio,S., D'Urbano,E., Iacovelli,L., and De,B.A. (2000a). Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol. Pharmacol.* 57, 826-831.

Sallese,M., Salvatore,L., D'Urbano,E., Sala,G., Storto,M., Launey,T., Nicoletti,F., Knopf,T., and De,B.A. (2000b). The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J.* 14, 2569-2580.

Samama,P., Cotecchia,S., Costa,T., and Lefkowitz,R.J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* 268, 4625-4636.

Samama,P., Pei,G., Costa,T., Cotecchia,S., and Lefkowitz,R.J. (1994). Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 45, 390-394.

Sarnago,S., Elorza,A., and Mayor,F., Jr. (1999). Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 34411-34416.

Scheerer,P., Park,J.H., Hildebrand,P.W., Kim,Y.J., Krauss,N., Choe,H.W., Hofmann,K.P., and Ernst,O.P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455, 497-502.

Scherrer,G., Tryoen-Toth,P., Filliol,D., Matifas,A., Laustriat,D., Cao,Y.Q., Basbaum,A.I., Dierich,A., Vonesh,J.L., Gaveriaux-Ruff,C., and Kieffer,B.L. (2006). Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 9691-9696.

Schmid,C.L., Raehal,K.M., and Bohn,L.M. (2008). Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on beta-arrestin-2 interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 1079-1084.

Schmid,E.M., Ford,M.G., Burtsey,A., Praefcke,G.J., Peak-Chew,S.Y., Mills,I.G., Benmerah,A., and McMahon,H.T. (2006). Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS. Biol.* *4*, e262.

Schmidt,C.J., Thomas,T.C., Levine,M.A., and Neer,E.J. (1992). Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J. Biol. Chem.* *267*, 13807-13810.

Schnorbusch,K., Lembrechts,R., Pintelon,I., Timmermans,J.P., Brouns,I., and Adriaensen,D. (2013). GABAergic signaling in the pulmonary neuroepithelial body microenvironment: functional imaging in GAD67-GFP mice. *Histochem. Cell Biol.*

Schulte,G., Schambony,A., and Bryja,V. (2010). beta-Arrestins - scaffolds and signalling elements essential for WNT/Frizzled signalling pathways? *Br. J. Pharmacol.* *159*, 1051-1058.

Schulz,R. (2001). The pharmacology of phosducin. *Pharmacol. Res.* *43*, 1-10.

Schwartz,T.W. and Holst,B. (2007). Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol. Sci.* *28*, 366-373.

Scott,M.G., Le,R.E., Perianin,A., Pierotti,V., Enslen,H., Benichou,S., Marullo,S., and Benmerah,A. (2002). Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *J. Biol. Chem.* *277*, 37693-37701.

Seachrist,J.L., Anborgh,P.H., and Ferguson,S.S. (2000). beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *J. Biol. Chem.* *275*, 27221-27228.

Seachrist,J.L., Laporte,S.A., Dale,L.B., Babwah,A.V., Caron,M.G., Anborgh,P.H., and Ferguson,S.S. (2002). Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *J. Biol. Chem.* *277*, 679-685.

Seifert,R., Gether,U., Wenzel-Seifert,K., and Kobilka,B.K. (1999). Effects of guanine, inosine, and xanthine nucleotides on beta(2)-adrenergic receptor/G(s) interactions: evidence for multiple receptor conformations. *Mol. Pharmacol.* *56*, 348-358.

Seifert,R., Wenzel-Seifert,K., Gether,U., and Kobilka,B.K. (2001). Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *297*, 1218-1226.

Sethakorn,N., Yau,D.M., and Dulin,N.O. (2010). Non-canonical functions of RGS proteins. *Cell Signal.* *22*, 1274-1281.

Shenoy,S.K. (2007). Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. *Circ. Res.* *100*, 1142-1154.

Shenoy,S.K., Barak,L.S., Xiao,K., Ahn,S., Berthouze,M., Shukla,A.K., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (2007). Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J. Biol. Chem.* *282*, 29549-29562.

Shenoy,S.K., Drake,M.T., Nelson,C.D., Houtz,D.A., Xiao,K., Madabushi,S., Reiter,E., Premont,R.T., Lichtarge,O., and Lefkowitz,R.J. (2006). beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *281*, 1261-1273.

Shenoy,S.K. and Lefkowitz,R.J. (2003). Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* *278*, 14498-14506.

Shenoy,S.K. and Lefkowitz,R.J. (2005). Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.* *280*, 15315-15324.

Shenoy,S.K., McDonald,P.H., Kohout,T.A., and Lefkowitz,R.J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* *294*, 1307-1313.

Shenoy,S.K., Modi,A.S., Shukla,A.K., Xiao,K., Berthouze,M., Ahn,S., Wilkinson,K.D., Miller,W.E., and Lefkowitz,R.J. (2009). Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 6650-6655.

Shenoy,S.K., Xiao,K., Venkataramanan,V., Snyder,P.M., Freedman,N.J., and Weissman,A.M. (2008). Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *283*, 22166-22176.

Shi,L. and Javitch,J.A. (2002). The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *42*, 437-467.

Shih,M., Lin,F., Scott,J.D., Wang,H.Y., and Malbon,C.C. (1999). Dynamic complexes of beta2-adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J. Biol. Chem.* *274*, 1588-1595.

- Shmuel,M., Nodel-Berner,E., Hyman,T., Rouvinski,A., and Altschuler,Y. (2007). Caveolin 2 regulates endocytosis and trafficking of the M1 muscarinic receptor in MDCK epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 1570-1585.
- Shukla,A.K., Kim,J., Ahn,S., Xiao,K., Shenoy,S.K., Liedtke,W., and Lefkowitz,R.J. (2010). Arresting a transient receptor potential (TRP) channel: beta-arrestin 1 mediates ubiquitination and functional down-regulation of TRPV4. *J. Biol. Chem.* 285, 30115-30125.
- Shukla,A.K., Manglik,A., Kruse,A.C., Xiao,K., Reis,R.I., Tseng,W.C., Staus,D.P., Hilger,D., Uysal,S., Huang,L.Y., Paduch,M., Tripathi-Shukla,P., Koide,A., Koide,S., Weis,W.I., Kossiakoff,A.A., Kobilka,B.K., and Lefkowitz,R.J. (2013). Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497, 137-141.
- Shukla,A.K., Violin,J.D., Whalen,E.J., Gesty-Palmer,D., Shenoy,S.K., and Lefkowitz,R.J. (2008). Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 9988-9993.
- Simon,M.I., Strathmann,M.P., and Gautam,N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
- Simonin,A. and Fuster,D. (2010). Nedd4-1 and beta-arrestin-1 are key regulators of Na⁺/H⁺ exchanger 1 ubiquitylation, endocytosis, and function. *J. Biol. Chem.* 285, 38293-38303.
- Simonin,F., Karcher,P., Boeuf,J.J., Matifas,A., and Kieffer,B.L. (2004). Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J. Neurochem.* 89, 766-775.
- Siu,F.Y., He,M., de,G.C., Han,G.W., Yang,D., Zhang,Z., Zhou,C., Xu,Q., Wacker,D., Joseph,J.S., Liu,W., Lau,J., Cherezov,V., Katritch,V., Wang,M.W., and Stevens,R.C. (2013). Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* 499, 444-449.
- Sjogren,B. and Neubig,R.R. (2010). Thinking outside of the "RGS box": new approaches to therapeutic targeting of regulators of G protein signaling. *Mol. Pharmacol.* 78, 550-557.
- Smith,F.D., Samelson,B.K., and Scott,J.D. (2011). Discovery of cellular substrates for protein kinase A using a peptide array screening protocol. *Biochem. J.* 438, 103-110.
- Smrcka,A.V. (2008). G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 2191-2214.
- So,M.K., Xu,C., Loening,A.M., Gambhir,S.S., and Rao,J. (2006). Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* 24, 339-343.
- Song,X., Coffa,S., Fu,H., and Gurevich,V.V. (2009). How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex? *J. Biol. Chem.* 284, 685-695.

Song,X., Gurevich,E.V., and Gurevich,V.V. (2007). Cone arrestin binding to JNK3 and Mdm2: conformational preference and localization of interaction sites. *J. Neurochem.* *103*, 1053-1062.

Stacey,M., Lin,H.H., Gordon,S., and McKnight,A.J. (2000). LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 284-289.

Stallaert,W., Dorn,J.F., van der Westhuizen,E., Audet,M., and Bouvier,M. (2012). Impedance responses reveal beta(2)-adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles. *PLoS. One.* *7*, e29420.

Stephens,L., Smrcka,A., Cooke,F.T., Jackson,T.R., Sternweis,P.C., and Hawkins,P.T. (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* *77*, 83-93.

STEPHENSON,R.P. (1956). A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* *11*, 379-393.

Stevens,P.A. and Milligan,G. (1998). Efficacy of inverse agonists in cells overexpressing a constitutively active beta2-adrenoceptor and type II adenylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* *123*, 335-343.

Stoffel,R.H., Randall,R.R., Premont,R.T., Lefkowitz,R.J., and Inglese,J. (1994). Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J. Biol. Chem.* *269*, 27791-27794.

Strader,C.D., Candelore,M.R., Hill,W.S., Sigal,I.S., and Dixon,R.A. (1989). Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *264*, 13572-13578.

Subramanian,C., Woo,J., Cai,X., Xu,X., Servick,S., Johnson,C.H., Nebenfuhr,A., and von Arnim,A.G. (2006). A suite of tools and application notes for in vivo protein interaction assays using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Plant J.* *48*, 138-152.

Sun,J. and Lin,X. (2008). Beta-arrestin 2 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 17085-17090.

Sun,W. and Yang,J. (2010). Molecular basis of lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Cell Signal.* *22*, 1799-1803.

Sun,Y., Cheng,Z., Ma,L., and Pei,G. (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* *277*, 49212-49219.

Sunahara,R.K., Dessauer,C.W., and Gilman,A.G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *36*, 461-480.

Sutton,R.B., Vishnivetskiy,S.A., Robert,J., Hanson,S.M., Raman,D., Knox,B.E., Kono,M., Navarro,J., and Gurevich,V.V. (2005). Crystal structure of cone arrestin at 2.3Å: evolution of receptor specificity. *J. Mol. Biol.* 354, 1069-1080.

Swaminath,G., Deupi,X., Lee,T.W., Zhu,W., Thian,F.S., Kobilka,T.S., and Kobilka,B. (2005). Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J. Biol. Chem.* 280, 22165-22171.

Swaminath,G., Xiang,Y., Lee,T.W., Steenhuis,J., Parnot,C., and Kobilka,B.K. (2004). Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J. Biol. Chem.* 279, 686-691.

Szabo,E.Z., Numata,M., Lukashova,V., Iannuzzi,P., and Orlowski,J. (2005). beta-Arrestins bind and decrease cell-surface abundance of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE5 isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 2790-2795.

Tang,Z., El,F.O., Betz,H., and Scheschonka,A. (2005). Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8. *J. Biol. Chem.* 280, 38153-38159.

Taylor,J.M., Jacob-Mosier,G.G., Lawton,R.G., Remmers,A.E., and Neubig,R.R. (1994). Binding of an alpha 2 adrenergic receptor third intracellular loop peptide to G beta and the amino terminus of G alpha. *J. Biol. Chem.* 269, 27618-27624.

Terrillon,S. and Bouvier,M. (2004). Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J.* 23, 3950-3961.

Tesmer,J.J., Dessauer,C.W., Sunahara,R.K., Murray,L.D., Johnson,R.A., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (2000). Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry* 39, 14464-14471.

Tesmer,V.M., Kawano,T., Shankaranarayanan,A., Kozasa,T., and Tesmer,J.J. (2005). Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science* 310, 1686-1690.

Thompson,M.D., Cole,D.E., and Jose,P.A. (2008). Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor signaling: insights from health and disease. *Methods Mol. Biol.* 448, 77-107.

Tohgo,A., Pierce,K.L., Choy,E.W., Lefkowitz,R.J., and Luttrell,L.M. (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* 277, 9429-9436.

Tolkovsky,A.M. and Levitzki,A. (1978). Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry* 17, 3795.

Tschische,P., Moser,E., Thompson,D., Vischer,H.F., Parzmair,G.P., Pommer,V., Platzer,W., Schwarzbraun,T., Schaidler,H., Smit,M.J., Martini,L., Whistler,J.L., and Waldhoer,M. (2010).

The G-protein coupled receptor associated sorting protein GASP-1 regulates the signalling and trafficking of the viral chemokine receptor US28. *Traffic*. 11, 660-674.

Tsien,R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.

Tsutsumi,R., Fukata,Y., Noritake,J., Iwanaga,T., Perez,F., and Fukata,M. (2009). Identification of G protein alpha subunit-palmitoylating enzyme. *Mol. Cell Biol.* 29, 435-447.

Valiquette,M., Parent,S., Loisel,T.P., and Bouvier,M. (1995). Mutation of tyrosine-141 inhibits insulin-promoted tyrosine phosphorylation and increased responsiveness of the human beta 2-adrenergic receptor. *EMBO J.* 14, 5542-5549.

van der Sluijs,P., Hull,M., Webster,P., Male,P., Goud,B., and Mellman,I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70, 729-740.

Venter,J.C., Adams,M.D., Myers,E.W., Li,P.W., Mural,R.J., Sutton,G.G., Smith,H.O., Yandell,M., Evans,C.A., Holt,R.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P., Ballew,R.M., Huson,D.H., Wortman,J.R., Zhang,Q., Kodira,C.D., Zheng,X.H., Chen,L., Skupski,M., Subramanian,G., Thomas,P.D., Zhang,J., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C., Broder,S., Clark,A.G., Nadeau,J., McKusick,V.A., Zinder,N., Levine,A.J., Roberts,R.J., Simon,M., Slayman,C., Hunkapiller,M., Bolanos,R., Delcher,A., Dew,I., Fasulo,D., Flanigan,M., Florea,L., Halpern,A., Hannenhalli,S., Kravitz,S., Levy,S., Mobarry,C., Reinert,K., Remington,K., Abu-Threideh,J., Beasley,E., Biddick,K., Bonazzi,V., Brandon,R., Cargill,M., Chandramouliswaran,I., Charlab,R., Chaturvedi,K., Deng,Z., Di,F., V, Dunn,P., Eilbeck,K., Evangelista,C., Gabrielian,A.E., Gan,W., Ge,W., Gong,F., Gu,Z., Guan,P., Heiman,T.J., Higgins,M.E., Ji,R.R., Ke,Z., Ketchum,K.A., Lai,Z., Lei,Y., Li,Z., Li,J., Liang,Y., Lin,X., Lu,F., Merkulov,G.V., Milshina,N., Moore,H.M., Naik,A.K., Narayan,V.A., Neelam,B., Nusskern,D., Rusch,D.B., Salzberg,S., Shao,W., Shue,B., Sun,J., Wang,Z., Wang,A., Wang,X., Wang,J., Wei,M., Wides,R., Xiao,C., Yan,C., Yao,A., Ye,J., Zhan,M., Zhang,W., Zhang,H., Zhao,Q., Zheng,L., Zhong,F., Zhong,W., Zhu,S., Zhao,S., Gilbert,D., Baumhueter,S., Spier,G., Carter,C., Cravchik,A., Woodage,T., Ali,F., An,H., Awe,A., Baldwin,D., Baden,H., Barnstead,M., Barrow,I., Beeson,K., Busam,D., Carver,A., Center,A., Cheng,M.L., Curry,L., Danaher,S., Davenport,L., Desilets,R., Dietz,S., Dodson,K., Doup,L., Ferreira,S., Garg,N., Gluecksmann,A., Hart,B., Haynes,J., Haynes,C., Heiner,C., Hladun,S., Hostin,D., Houck,J., Howland,T., Ibegwam,C., Johnson,J., Kalush,F., Kline,L., Koduru,S., Love,A., Mann,F., May,D., McCawley,S., McIntosh,T., McMullen,I., Moy,M., Moy,L., Murphy,B., Nelson,K., Pfannkoch,C., Pratts,E., Puri,V., Qureshi,H., Reardon,M., Rodriguez,R., Rogers,Y.H., Romblad,D., Ruhfel,B., Scott,R., Sitter,C., Smallwood,M., Stewart,E., Strong,R., Suh,E., Thomas,R., Tint,N.N., Tse,S., Vech,C., Wang,G., Wetter,J., Williams,S., Williams,M., Windsor,S., Winn-Deen,E., Wolfe,K., Zaveri,J., Zaveri,K., Abril,J.F., Guigo,R., Campbell,M.J., Sjolander,K.V., Karlak,B., Kejariwal,A., Mi,H., Lazareva,B., Hatton,T., Narechania,A., Diemer,K., Muruganujan,A., Guo,N., Sato,S., Bafna,V., Istrail,S., Lippert,R., Schwartz,R., Walenz,B., Yooseph,S., Allen,D., Basu,A., Baxendale,J., Blick,L., Caminha,M., Carnes-Stine,J., Caulk,P., Chiang,Y.H., Coyne,M., Dahlke,C., Mays,A., Dombroski,M., Donnelly,M., Ely,D., Esparham,S., Fosler,C., Gire,H.,

Glanowski,S., Glasser,K., Glodek,A., Gorokhov,M., Graham,K., Gropman,B., Harris,M., Heil,J., Henderson,S., Hoover,J., Jennings,D., Jordan,C., Jordan,J., Kasha,J., Kagan,L., Kraft,C., Levitsky,A., Lewis,M., Liu,X., Lopez,J., Ma,D., Majoros,W., McDaniel,J., Murphy,S., Newman,M., Nguyen,T., Nguyen,N., and Nodell,M. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Vilardaga,J.P., Steinmeyer,R., Harms,G.S., and Lohse,M.J. (2005). Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat. Chem. Biol.* 1, 25-28.

Vines,C.M., Revankar,C.M., Maestas,D.C., LaRusch,L.L., Cimino,D.F., Kohout,T.A., Lefkowitz,R.J., and Prossnitz,E.R. (2003). N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J. Biol. Chem.* 278, 41581-41584.

Vishnivetskiy,S.A., Baameur,F., Findley,K.R., and Gurevich,V.V. (2013). Critical role of the central 139-loop in stability and binding selectivity of arrestin-1. *J. Biol. Chem.* 288, 11741-11750.

Vishnivetskiy,S.A., Gimenez,L.E., Francis,D.J., Hanson,S.M., Hubbell,W.L., Klug,C.S., and Gurevich,V.V. (2011). Few residues within an extensive binding interface drive receptor interaction and determine the specificity of arrestin proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 24288-24299.

Vishnivetskiy,S.A., Hirsch,J.A., Velez,M.G., Gurevich,Y.V., and Gurevich,V.V. (2002). Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J. Biol. Chem.* 277, 43961-43967.

Vishnivetskiy,S.A., Hosey,M.M., Benovic,J.L., and Gurevich,V.V. (2004). Mapping the arrestin-receptor interface. Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 1262-1268.

Vishnivetskiy,S.A., Paz,C.L., Schubert,C., Hirsch,J.A., Sigler,P.B., and Gurevich,V.V. (1999). How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J. Biol. Chem.* 274, 11451-11454.

Vishnivetskiy,S.A., Schubert,C., Climaco,G.C., Gurevich,Y.V., Velez,M.G., and Gurevich,V.V. (2000). An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J. Biol. Chem.* 275, 41049-41057.

Vrecl,M., Anderson,L., Hanyaloglu,A., McGregor,A.M., Groarke,A.D., Milligan,G., Taylor,P.L., and Eidne,K.A. (1998). Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol. Endocrinol.* 12, 1818-1829.

Vrecl,M., Jorgensen,R., Pogacnik,A., and Heding,A. (2004). Development of a BRET2 screening assay using beta-arrestin 2 mutants. *J. Biomol. Screen.* 9, 322-333.

Wacker,D., Wang,C., Katritch,V., Han,G.W., Huang,X.P., Vardy,E., McCorvy,J.D., Jiang,Y., Chu,M., Siu,F.Y., Liu,W., Xu,H.E., Cherezov,V., Roth,B.L., and Stevens,R.C. (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* 340, 615-619.

Wall,M.A., Coleman,D.E., Lee,E., Iniguez-Lluhi,J.A., Posner,B.A., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* 83, 1047-1058.

Wang,C., Jiang,Y., Ma,J., Wu,H., Wacker,D., Katritch,V., Han,G.W., Liu,W., Huang,X.P., Vardy,E., McCorvy,J.D., Gao,X., Zhou,X.E., Melcher,K., Zhang,C., Bai,F., Yang,H., Yang,L., Jiang,H., Roth,B.L., Cherezov,V., Stevens,R.C., and Xu,H.E. (2013a). Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science* 340, 610-614.

Wang,C., Wu,H., Katritch,V., Han,G.W., Huang,X.P., Liu,W., Siu,F.Y., Roth,B.L., Cherezov,V., and Stevens,R.C. (2013b). Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 497, 338-343.

Wang,D., Surratt,C.K., and Sadee,W. (2000). Calmodulin regulation of basal and agonist-stimulated G protein coupling by the mu-opioid receptor (OP(3)) in morphine-pretreated cell. *J. Neurochem.* 75, 763-771.

Wang,P., Wu,Y., Ge,X., Ma,L., and Pei,G. (2003). Subcellular localization of beta-arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus. *J. Biol. Chem.* 278, 11648-11653.

Wang,X., Zeng,W., Soyombo,A.A., Tang,W., Ross,E.M., Barnes,A.P., Milgram,S.L., Penninger,J.M., Allen,P.B., Greengard,P., and Muallem,S. (2005). Spinophilin regulates Ca²⁺ signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors. *Nat. Cell Biol.* 7, 405-411.

Wang,Y., Zhou,Y., Szabo,K., Haft,C.R., and Trejo,J. (2002). Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Mol. Biol. Cell* 13, 1965-1976.

Warne,T., Serrano-Vega,M.J., Baker,J.G., Moukhametzianov,R., Edwards,P.C., Henderson,R., Leslie,A.G., Tate,C.G., and Schertler,G.F. (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491.

Wei,H., Ahn,S., Shenoy,S.K., Karnik,S.S., Hunyady,L., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10782-10787.

Weiss,J.M., Morgan,P.H., Lutz,M.W., and Kenakin,T.P. (1996). The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J. Theor. Biol.* 181, 381-397.

- West,R.E., Jr., Moss,J., Vaughan,M., Liu,T., and Liu,T.Y. (1985). Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J. Biol. Chem.* *260*, 14428-14430.
- Westfield,G.H., Rasmussen,S.G., Su,M., Dutta,S., Devree,B.T., Chung,K.Y., Calinski,D., Velez-Ruiz,G., Oleskie,A.N., Pardon,E., Chae,P.S., Liu,T., Li,S., Woods,V.L., Jr., Steyaert,J., Kobilka,B.K., Sunahara,R.K., and Skiniotis,G. (2011). Structural flexibility of the G alpha s alpha-helical domain in the beta2-adrenoceptor Gs complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 16086-16091.
- Wettschureck,N. and Offermanns,S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* *85*, 1159-1204.
- Whistler,J.L., Enquist,J., Marley,A., Fong,J., Gladher,F., Tsuruda,P., Murray,S.R., and von,Z.M. (2002). Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* *297*, 615-620.
- Wickman,K.D. and Clapham,D.E. (1995). G-protein regulation of ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* *5*, 278-285.
- Wikstrom,K., Reid,H.M., Hill,M., English,K.A., O'Keeffe,M.B., Kimbembe,C.C., and Kinsella,B.T. (2008). Recycling of the human prostacyclin receptor is regulated through a direct interaction with Rab11a GTPase. *Cell Signal.* *20*, 2332-2346.
- Wilden,U., Hall,S.W., and Kuhn,H. (1986). Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 1174-1178.
- Williams,S.L., Lutz,S., Charlie,N.K., Vettel,C., Ailion,M., Coco,C., Tesmer,J.J., Jorgensen,E.M., Wieland,T., and Miller,K.G. (2007). Trio's Rho-specific GEF domain is the missing Galpha q effector in *C. elegans*. *Genes Dev.* *21*, 2731-2746.
- Witherow,D.S., Garrison,T.R., Miller,W.E., and Lefkowitz,R.J. (2004). beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 8603-8607.
- Wu,J.H., Peppel,K., Nelson,C.D., Lin,F.T., Kohout,T.A., Miller,W.E., Exum,S.T., and Freedman,N.J. (2003). The adaptor protein beta-arrestin2 enhances endocytosis of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* *278*, 44238-44245.
- Wu,Y., Zhao,Y., Ma,X., Zhu,Y., Patel,J., and Nie,Z. (2013). The Arf GAP AGAP2 interacts with beta-arrestin2 and regulates beta2-adrenergic receptor recycling and ERK activation. *Biochem. J.* *452*, 411-421.
- Wyatt,D., Malik,R., Vesecky,A.C., and Marchese,A. (2011). Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* *286*, 3884-3893.

- Xiao,K., McClatchy,D.B., Shukla,A.K., Zhao,Y., Chen,M., Shenoy,S.K., Yates,J.R., III, and Lefkowitz,R.J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 12011-12016.
- Xiao,K., Shenoy,S.K., Nobles,K., and Lefkowitz,R.J. (2004). Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *J. Biol. Chem.* *279*, 55744-55753.
- Xie,Q., Soutto,M., Xu,X., Zhang,Y., and Johnson,C.H. (2011). Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging in plant seedlings and mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* *680*, 3-28.
- Xu,C., Peter,M., Bouquier,N., Ollendorff,V., Villamil,I., Liu,J., Fagni,L., and Perroy,J. (2013). REV, A BRET-Based Sensor of ERK Activity. *Front Endocrinol. (Lausanne)* *4*, 95.
- Xu,T.R., Baillie,G.S., Bhari,N., Houslay,T.M., Pitt,A.M., Adams,D.R., Kolch,W., Houslay,M.D., and Milligan,G. (2008). Mutations of beta-arrestin 2 that limit self-association also interfere with interactions with the beta2-adrenoceptor and the ERK1/2 MAPKs: implications for beta2-adrenoceptor signalling via the ERK1/2 MAPKs. *Biochem. J.* *413*, 51-60.
- Xu,X., Soutto,M., Xie,Q., Servick,S., Subramanian,C., von Arnim,A.G., and Johnson,C.H. (2007). Imaging protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in plant and mammalian cells and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 10264-10269.
- Zerial,M. and McBride,H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 107-117.
- Zhan,X., Gimenez,L.E., Gurevich,V.V., and Spiller,B.W. (2011). Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J. Mol. Biol.*
- Zhang,C., Srinivasan,Y., Arlow,D.H., Fung,J.J., Palmer,D., Zheng,Y., Green,H.F., Pandey,A., Dror,R.O., Shaw,D.E., Weis,W.I., Coughlin,S.R., and Kobilka,B.K. (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* *492*, 387-392.
- Zhang,F.L. and Casey,P.J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* *65*, 241-269.
- Zhang,S., Coso,O.A., Collins,R., Gutkind,J.S., and Simonds,W.F. (1996). A C-terminal mutant of the G protein beta subunit deficient in the activation of phospholipase C-beta. *J. Biol. Chem.* *271*, 20208-20212.
- Zhuang,T., Chen,Q., Cho,M.K., Vishnivetskiy,S.A., Iverson,T.M., Gurevich,V.V., and Sanders,C.R. (2013). Involvement of distinct arrestin-1 elements in binding to different functional forms of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *110*, 942-947.

Zidar,D.A., Violin,J.D., Whalen,E.J., and Lefkowitz,R.J. (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 9649-9654.

Zimmerman,B., Beautrait,A., Aguila,B., Charles,R., Escher,E., Claing,A., Bouvier,M., and Laporte,S.A. (2012). Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci. Signal.* 5, ra33.

Zimmerman,B., Simaan,M., Akoume,M.Y., Houri,N., Chevallier,S., Seguela,P., and Laporte,S.A. (2011). Role of ssarrestins in bradykinin B2 receptor-mediated signalling. *Cell Signal.* 23, 648-659.

Zurn,A., Zabel,U., Vilardaga,J.P., Schindelin,H., Lohse,M.J., and Hoffmann,C. (2009). Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes. *Mol. Pharmacol.* 75, 534-541.

Annexes

Annexe 1

Liste des autres articles

1. **Audet,M.** and Bouvier,M. (2012). Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell 151*, 14-23. (annexe 2).
2. Gales,C., Van Durm,J.J., Schaak,S., Pontier,S., Percherancier,Y., **Audet,M.**, Paris,H., and Bouvier,M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol. 13*, 778-786. (annexe 3).
3. Hamdan,F.F., **Audet,M.**, Garneau,P., Pelletier,J., and Bouvier,M. (2005). High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J. Biomol. Screen. 10*, 463-475. (annexe 4).
4. Stallaert,W., Dorn,J.F., van der Westhuizen,E., **Audet,M.**, and Bouvier,M. (2012). Impedance responses reveal beta(2)-adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles. *PLoS. One. 7*, e29420. (annexe 5).

Annexe 2

Restructuring G-Protein-Coupled Receptor Activation

Martin Audet and Michel Bouvier

Cell 151, 14-23, (2012)

Annexe 3

Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes

Céline Galès, Joost JJ Van Durm, Stéphane Schaak, Stéphanie Pontier, Yann Percherancier, **Martin Audet**, Hervé Paris et Michel Bouvier.

Nature Structural and Molecular Biology 13, 778-786, (2006)

Annexe 4

High-Throughput Screening of G Protein-Coupled Receptor Antagonists Using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer 1-Based β -Arrestin2 Recruitment Assay

Fadi F. Hamdan, **Martin Audet**, Philippe Garneau, Jerry Pelletier and Michel Bouvier.

Journal of Biomolecular Screening 10, 463-475 (2005)

Annexe 5

Impedance Responses Reveal β_2 -Adrenergic Receptor Signaling Pluridimensionality and Allow Classification of Ligands with Distinct Signaling Profiles

Wayne Stallaert, Jonas F. Dorn, Emma van der Westhuizen, **Martin Audet**, Michel Bouvier.

PLoS One 7, e29420, (2012)